

**Антиоксидантна активність спиртових екстрактів
плодових тіл грибів видів *Hericium alpestris*, *Hericium
erinaceus***

Дипломна робота

Рівень вищої освіти - перший (бакалавр)

Виконала:

студентка 4-го курсу, групи 400

спеціальності 091 «Біологія»

Шнайдер І.С.

Керівник: к.б.н., доц. Волощук О.М.

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню антиоксидантних властивостей етанольних екстрактів та амінокислотного складу плодових тіл грибів *H. erinaceus* та *H. alpestris*.

Встановлено, що зі зростанням концентрації екстрактів антиоксидантна активність зростає. Показано, що у концентрації 0,05-0,15 мг/мл антиоксидантна активність спиртових екстрактів плодових тіл грибів суттєво не відрізняється, проте у межах концентрацій 0,25-0,5 мг/мл *H. alpestris* проявляє вищу антиоксидантну активність, вищу здатність поглинати радикали DPPH та володіє більшою відновною здатністю.

Показано, що амінокислотний склад *H. alpestris* відрізняється від *H. erinaceus*. Вміст амінокислот у *H. alpestris* вищий порівняно з *H. erinaceus*, при цьому їх плодові тіла містять більшу частку гідрофобних амінокислот, нижчий вміст незамінних амінокислот та збіднені на сульфуровмісні амінокислоти порівняно з *H. erinaceus*.

Ключові слова: антиоксиданти, спиртові екстракти, амінокислотний склад, *H. erinaceus*, *H. alpestris*.

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of the antioxidant properties of ethanolic extracts and the amino acid composition of the fruiting bodies of the mushrooms *H. erinaceus* and *H. alpestris*.

It was established that the antioxidant activity increases with the increase in the concentration of the extracts. It was shown that at a concentration of 0.05-0.15 mg/ml, the antioxidant activity of alcoholic extracts of mushroom fruiting bodies does not differ significantly, but within the concentration range of 0.25-0.5 mg/ml, *H. alpestris* shows higher antioxidant activity, a higher ability absorb DPPH radicals and has a greater reducing capacity.

It is shown that the amino acid composition of *H. alpestris* differs from that of *H. erinaceus*. The amino acid content of *H. alpestris* is higher compared to *H. erinaceus*, while their fruiting bodies contain a higher proportion of hydrophobic amino acids, a lower content of essential amino acids and are depleted in sulfur-containing amino acids compared to *H. erinaceus*.

Key words: antioxidants, alcohol extracts, amino acid composition, *H. erinaceus*, *H. alpestris*.

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

I.C.Шнайдер

(підпис)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	5
I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1. Історичні аспекти дослідження грибів.....	7
2. Характеристика біологічно активних сполук грибів.....	8
2.1 Полісахариди як джерело антиоксидантів.....	9
2.2 Антиоксидантна роль поліфенолів та флавоноїдів грибів.....	12
2.3 Органічні речовини грибів, що володіють антиоксидантними властивостями.....	14
2.4 Антиоксидантний потенціал грибів <i>in vivo</i>	20
3. Гриби роду <i>Hericium</i> як перспективні джерела біологічно активних сполук	22
II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	27
ВИСНОВКИ	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	34
ДОДАТКИ	40

ВСТУП

Гриби не перестають викликати інтерес наукової спільноти, оскільки їх визнано перспективним джерелом біотерапевтичних засобів та цінним харчовим продуктом [1]. Відомо, що гриби збагачені на протеїни, містять низький рівень загального жиру та високу частку поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що робить їх придатними для низькокалорійних дієт. Їстівні гриби також є джерелом вітамінів B₁, B₂, B₁₂, C, D і E [2]. Окрім цього, гриби є цінним джерелом антиоксидантних сполук.

На сьогодні залишається актуальною проблема пошуку природніх джерел антиоксидантів. Особливу увагу привертають гриби роду *Hericium*, а саме види, *H. erinaceus* та *H. alpestre*. Гриби занесені до Червоних списків деяких європейських та азіатських країн. Відомо, що плодове тіло *H. erinaceus* містять у своєму складі білки, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, ліпополісахариди, глікопротеїни, лектини, феноли, полікетиди, терпени, пренілові ароматичні компоненти, вітаміни B₁ і B₂, нікотинову кислоту, ергостерол (провітамін D₂), 16 видів амінокислот (з них сім незамінних) та різноманітні мікроелементи. Також *H. erinaceus* проявляють широкий спектр дії: протипухлинну, протимікробну, протидіабетичну, антиоксидантну, гастропротекторну, імуномодулюючу тощо. Слід підкреслити, що відомі активні сполуки, виділені з міцелію *H. erinaceus* – гериценони і еринацини є стимуляторами росту і регенерації відростків нервових клітин, тому вони можуть слугувати основою для розробки нових лікарських препаратів проти когнітивних порушень, хвороби Паркінсона, хвороби Альцгеймера та інших захворювань нервової системи. *H. alpestre* ще не достатньо вивчений, інформація, щодо його складу та властивостей практично відсутня.

Існує кілька експериментальних методів визначення антиоксидантної активності сполук грибів. Ці методи відрізняються за принципом аналізу, умовами експерименту та механізмом реакції. Найбільш ефективними, доступними та швидкими методами є метод визначення загальної антиоксидантної активності форсфоромолібденовим методом, який дозволяє

виявити антиоксидантну здатність ліпофільних і гідрофільних сполук, присутніх в екстрактах, і базується на відновленні фосфомолібдену VI в V. Метод оцінки поглинання радикалів DPPH, широко використовується для перевірки антиоксидантної активності сполук, і базується на здатності різних природних зразків поглинати вільні радикали. Проводять оцінку визначення відновної здатності шляхом відновлення фериціанідного комплексу, що дає можливість оцінити здатність екстрактів відновлювати іон фериціаніду до фероціаніду в присутності іона заліза.

Метою роботи було визначення антиоксидантних властивостей етанолових екстрактів та амінокислотного складу плодових тіл грибів *H. erinaceus* та *H. alpestris*. Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити загальну антиоксидантну активність, відновну здатність та DPPH-інгібуючу активність 70 % етанольних екстрактів плодових тіл грибів *H. erinaceus* та *H. alpestris*.
2. Визначити амінокислотний склад грибів *H. erinaceus* та *H. alpestris*.

I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Історичні аспекти дослідження грибів

Упродовж тисячоліть люди активно застосовували гриби для лікування хворих, або для харчування [3]. Справжня поживна цінність грибів швидко стала відомою та визнаною не лише грибниками та фермерами, а й звичайними споживачами. На додаток до гарного смаку, гриби мають хімічний склад з високим вмістом білків, низьким рівнем загального жиру та високою часткою поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що робить їх придатними для низькокалорійних дієт. Їстівні гриби забезпечують високий вміст вітамінів B₁, B₂, B₁₂, C, D і E [4]. Крім того, гриби мають низький глікемічний індекс і високий вміст маніту, що особливо корисно для діабетиків. Гриби мають дуже низьку концентрацію натрію (Na⁺), що корисно для пацієнтів з гіпертонією, і високий вміст калію (K⁺) і фосфору (P). В Азії гриби використовуються як важливе джерело домашніх засобів проти різних захворювань, що супроводжуються окисним стресом.

На даний час багато людей продовжує активно збирати та споживати дикорослі гриби в їжу, їх попит зростає, а разом з ним значно зросло культивування грибів. Зараз на ринку з'явилися культивовані гриби, і грибовництво стає все більш популярним у всьому світі [4]. Загалом з 14000 зареєстрованих грибів понад 1069 видів грибів були задокументовані як їстівні та понад 270 володіють лікарськими властивостями [5].

Ліки, отримані з грибів, використовуються в сучасній клінічній терапії на Тайвані, Японії, Китаї, Південній Кореї та інших азіатських країнах. З цих препаратів було виділено кілька біологічно активних сполук, включаючи високомолекулярні полісахариди (такі як β-D-глюкани та глюкуронооксиломанани), білки, полісахарид-білкові комплекси, ліпополісахариди, глікопротеїни та лектини, а також низькомолекулярні метаболіти, такі як лактони, терпеноїди, алкалоїди, стерини та інші фенольні хімічні речовини [6].

Вуглеводи складають більшу частину сухої речовини в грибах і містять як розчинні (рамноза, глікоген, маніт і глюкоза), так і нерозчинні (хітин, маннани та β -глюкан) вуглеводи. На додаток до присутності вітамінів В і D, мінералів і амінокислот, було виявлено, що гриби містять полісахариди (37-48%), клітковину (13-24%), пептиди, білки (20-25%), протеоглікани, фенольні сполуки, терпени та лектини [7]. Гриби також містять ергостерон і ланостерол, який проявляє антигіпертензивні, імуномодулюючі, протипухлинні, антибактеріальні, антиоксидантні, антигіпохолестеринемічні, антигіперглікемічні, противірусні, протигрибкові, протизапальні та антиостеопоротичні властивості, що зробило їх придатними для використання в харчових продуктах, косметичі, біомедицині, сільському господарстві [7].

2. Характеристика біологічно активних сполук грибів

Підтверджено, що дикі гриби містять більше клітковини та біологічно активних сполук, ніж в культивованих грибів [8]. Грибні полісахариди значно відрізняються від інших за низкою показників: молекулярною масою, хімічними властивостями, ступенем розгалуженості, довжиною скелета, тривимірною орієнтацією та іншими характеристиками [9].

На відміну від більшості рослинних полісахаридів, які мають складну структуру, що складаються з пектинових полісахаридів, більшість грибних полісахаридів є або β - або D-глюканом, або змішаним глюканом. Глюкани містять різноманітність зв'язків і зазвичай належать до $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 6)$ -D-глюканів, $(1 \rightarrow 3)$ -D-глюканів та $(1 \rightarrow 6)$ -D-глюканів [10]. β -D-глюкани функціонують як модифікатори біологічної відповіді, стимулюючи вироблення макрофагів, НК-клітин, Т-клітин і цитокінів. Кілька β -D-глюканів також мають здатність стимулювати спленоцити та тимоцити, а також виявляють значні антиоксидантні властивості [11].

У літературі показано, що їстівні гриби містять різноманітні імуномодулюючі гетероглікани, які складаються з цукрів, включаючи манозу, галактозу, а також фукозу та глюкозу в різних молярних співвідношеннях [12].

Науковцями доведено, що полісахариди виявляють різноманітні антидіабетичні властивості, включаючи антиоксидантну, гіпоглікемічну, гіполіпідемічну та протизапальну дію, яка сприяє збільшенню маси β -клітин підшлункової залози, а також полегшує наслідки розладів β -клітин [13].

На сьогодні відомо багато біоактивних полісахаридів, які виділені з грибів, наприклад, лентинан з *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, Grifon-D з *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, який пригнічує активацію сигнальних шляхів NF- κ B, JNK і p38 MAPK, а також утворення активних форм кисню, має антиапоптозну та антидисфункціональну активність у щурів із діабетом [14]; шизофіллан з *Schizophyllum commune*, полісахарид К (PSK або крестин) з *Coriolus versicolor* (L.) Quel, глюкани та гетероглікани з *Lentinus squarrosulus* (Mont.) та подібні полісахариди з багатьох інших грибів, включаючи *Pleurotus florida* Singer, *P. ostreatus* (Jacq.ex,fr), *Termitomyces robustus* (Beeli); гіспідин, виділений з *Phellinus linteus* (Berk. and M.A. Curtis) Teng. виявляє антиоксидантну активність і може покращувати стан β -клітин шляхом інгібування індукованого H_2O_2 апоптозу, а також здатний посилювати секрецію інсуліну. Потенційно імуномодуючою, антиоксидантною, протівірусною, протизапальною, антиканцерогенною, нейропротекторною та протипухлинною дією володіють *R. Heim* і *Calocybe indica* Purkayastha і *A. Chandra*.

2.1. Полісахариди як джерело антиоксидантів

Полісахариди, включаючи полісахаридно-білкові комплекси, були визнані класом основних біоактивних складових їстівних і лікарських грибів [15]. Вони діють насамперед як адаптогени та імуностимулятори. Імуностимулюючий ефект грибних полісахаридів має переважно профілактичний характер і відноситься до неінвазивних методів лікування, відіграючи роль у профілактиці інфекційних захворювань і метастазів пухлин.

Антиоксидантна активність грибних сполук вже була широко вивчена, і ефекти, включаючи окисне окислення ліпідів і пригнічення утворення MDA

(малонового діальдегіду), зниження рівня ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) у людей, хімічну активність поглинання вільних радикалів та інші фактори були добре відомі. Також цікавим фактом залишається і те, що гриби містять багато різних сполук, деякі з яких є унікальними для певних видів грибів.

Процедура екстракції та метод, який використовується для очищення отриманих фракцій полісахаридів, залежить від виду грибів і фізичних властивостей полісахаридів. Зазвичай ці полісахариди виділяли з гарячого водного екстракту просто шляхом осадження етанолом без подальшого очищення [16]. Очищення неочищених полісахаридів зазвичай здійснюється хроматографічними методами, такими як ексклюзія (SEC) та іонообмінна хроматографія (ІЕС), а також шляхом ферментативного очищення з використанням целюлаз, амілаз і протеаз.

Деякі дослідження показали, що очищені грибні полісахариди мають нижчу антиоксидантну активність, ніж оригінальні сирі екстракти. Полісахариди в клітинній стінці грибів можуть зв'язуватися ковалентними (складноєфірними) зв'язками з білками через залишки тирозину та/або ферулової кислоти в результаті процесів деградації лігніну [17]. Однак інші дослідження повідомляли про вищу антиоксидантну активність у чистій полісахаридній фракції, наприклад, полісахариди *A. brasiliensis*, отримані шляхом депротеїнізації пронази, продемонстрували високу антиоксидантну активність проти $\cdot\text{OH}$ та $\text{O}_2^{\cdot-}$ радикалів, виміряних спіноловлюванням електронного парамагнітного резонансу (EPR). Ці полісахариди склалися в основному з (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-глюканів.

Антиоксидантну дію грибних полісахаридів можна визначити за допомогою різноманітних методів аналізу, таких як азінобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонат (ABTS) і 1,1-дифеніл-2-пікрілгідрозил (DPPH), відновної здатності гідроксильних радикалів [18].

Встановлено, що грибні антиоксиданти можуть проявляти свої захисні властивості на різних стадіях процесу окиснення та за різними механізмами

[19]. Існує два основних типи грибних антиоксидантів, а саме первинні (розрив ланцюга, поглиначі вільних радикалів) і вторинні, або профілактичні.

Вторинні антиоксиданти утворюються внаслідок дезактивації металів, інгібування або розпаду гідропероксидів ліпідів, регенерації первинних антиоксидантів, гасіння синглетного кисню (O_2) тощо. Деякі грибні речовини, які виявляють антиоксидантну активність, функціонують як індуктори або клітинні сигнали, що призводять до змін в експресії генів, що у свою чергу призводить до активації ферментів, які усувають АФК.

Для ідентифікації грибів, які виявляють антиоксидантні властивості, та їх кількісного визначення застосовують різні аналітичні методи: високоефективну рідинну хроматографію (HPLC) і газову хроматографію (GC) у поєднанні з окремими пристроями виявлення, ядерний магнітний резонанс (ЯМР), інфрачервоне перетворення Фур'є (FT-IR), UV-VIS спектроскопію та різні спектрофотометричні аналізи [20].

Грибні полісахариди та глікокон'югати можуть бути корисними для створення нових ліків або дієтичних добавок на натуральній основі, а також для профілактики та лікування розладів, спричинених окиснювальним стресом. Незважаючи на захисний бар'єр, створений слизовою оболонкою, мікробні патогени можуть спричинити окисне пошкодження та запальні реакції ШКТ із залученням епітелію та імунних/запальних клітин. Висока антиоксидантна здатність полісахаридів їстівних грибів може запобігти окисному ушкодженню ліпідів [15] і патогенезу різних захворювань ШКТ, включаючи пептичну виразку, рак ШКТ і запальні захворювання кишечника, які частково зумовлено окисним стресом.

Екстракти полісахаридів виявилися термостійкими та зберігають високий антиоксидантний потенціал, незважаючи на всі обробки, застосовані при їх виготовленні.

2.2. Антиоксидантна роль поліфенолів та флавоноїдів грибів

Поліфеноли є найбільш поширеними антиоксидантами в раціоні. За останні 20 років дослідження впливу харчових поліфенолів на здоров'я людини отримали значний розвиток. Однією з головних проблем у з'ясуванні впливу поліфенолів на здоров'я є велика кількість фенольних сполук, які містяться в продуктах харчування [4], що мають різну біологічну активність.

У грибах основними фенольними сполуками є фенолкарбонові кислоти. Фенольні кислоти можна розділити на дві основні групи – гідроксибензойні кислоти та гідроксикоричні кислоти, які походять від нефенольних молекул бензойної та коричної кислот відповідно [21].

Похідні гідроксибензойної кислоти зазвичай зустрічаються у зв'язаній формі і зазвичай є компонентом складної структури, наприклад, лігніни та гідролізовані таніни. Вони також можуть бути пов'язані з цукрами або органічними кислотами. Похідні гідроксикоричної кислоти в основному присутні у зв'язаній формі, пов'язані зі структурними компонентами клітинної стінки, такими як целюлоза, лігнін і білки, а також пов'язані з органічними кислотами, такими як винна або хінна кислоти (тобто хлорогенова кислота), через складноефірні зв'язки [22].

Гідроксикоричні кислоти є більш поширеними, ніж гідроксибензойні кислоти, і складаються в основному з *n*-кумарової, кавової, ферулової та синапінової кислот. Ці кислоти рідко зустрічаються у вільній формі, за винятком обробленої їжі, яка пройшла заморожування, стерилізацію або ферментацію. Зв'язані форми є глікозильованими похідними або ефірами хінної кислоти, шикімової кислоти та винної кислоти [21].

Найпоширенішими похідними бензойної кислоти, знайденими в грибах, є *n*-гідроксибензойна, протокатехінова, галова, гентизинова, гомогентизинова, ванілінова, 5-сульфосаліцилова, сиригнінова, вератрієва, ванілін. Більшість ідентифікованих похідних коричної кислоти в грибах, це *n*-кумарова, *o*-кумарова, кавова, ферулова, синапінова, 3-*o*-кофеілхінова, 4-*o*-

кофеїлхінова, 5-о-кофеїлхінова [23]. Крім того, можуть бути присутніми елагові та дубильні кислоти.

Окрім антиоксидантних властивостей, поліфеноли володіють прооксидантною здатністю, яка базується на структурі конкретного поліфенолу та окислювально-відновному процесі, також може включати підвищення рівня білків, або зниження рівні окислених білків і ліпідів. Наприклад, епігалокатехін-3-галат (EGCG) індукує активацію білкових каспаз-3 і N-кінцевих кіназ (JNK), які належать до групи MAPK, які відіграють роль у процесі запрограмованої клітинної смерті, тобто апоптозі. Ці різні ефекти залежать від типу клітин, умов стресу, концентрації та часу впливу EGCG. Можливо, низькі концентрації EGCG активують MAPK, що призводить до експресії генів, опосередкованої антиоксидантним реагуючим елементом (ARE), тоді як вищі концентрації та тривала активація MAPK призводять до апоптозу [24].

Також поліфеноли, зокрема, дубильна кислота, галова кислота та сполуки катехіну, також взаємодіють зі стероїдними рецепторами. Це може призвести до зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій і, зрештою, до зниження або збільшення продукування АФК. Як антиоксиданти поліфеноли можуть покращити виживання клітин; як прооксиданти вони можуть індукувати апоптоз і запобігати росту пухлин, а також боротися з бактеріальними та вірусними інфекціями шляхом прямого окиснювального пошкодження або за допомогою різноманітних вроджених і адаптивних механізмів [25].

Флавоноїди. У різних їстівних грибах містяться флавоноїди, зокрема, мірицетин, хризин, катехін, гесперетин, нарингенін, нарингін, формометин, біоханін, пірогалол, ресвератрол, кверцетин, рутин, кемпферол [26]. Зовсім недавно аналіз метанольного екстракту *Cantharellus cibarius* показав, що феноли були його основними антиоксидантними компонентами, але за ними йшли флавоноїди, вміст яких становив приблизно 86% від загального вмісту фенолу.

Здатність флавоноїдів інгібувати АФК визначається наявністю та положенням кількох гідроксильних груп у їхній структурі. Подвійний зв'язок і карбонільна функція в гетероциклі або полімеризація ядерної структури підвищує їх активність, утворюючи більш стабільний флавоноїдний радикал через кон'югацію та електронну делокалізацію [25]. Механізми дії флавоноїдів, такі як модуляція сигнальних шляхів і експресія генів, також можуть сприяти захисним властивостям флавоноїдів.

Цікавим фактом є те, що кверцетин може посилити тяжкість нирково-клітинної карциноми через пухлиногенний механізм дії завдяки прооксидантній дії. Він діє як антиоксидант у низьких дозах або як прооксидант у високих дозах [27]. Що стосується поглинання та біодоступності кверцетину, було продемонстровано, що в аглікозильованій формі він стає ліпофільною молекулою та може легко поглинатися через епітелій у клітинах товстої кишки. Подібно до ресвератролу, кверцетин міг би вбудовуватися в клітинні мембрани та за певних умов виявляти прооксидантну активність шляхом утворення АФК.

2.3. Органічні речовини грибів, що володіють антиоксидантними властивостями

Доведено, що певні екстракти та компоненти грибів, включаючи фенольні сполуки, тритерпеноїди та полісахариди, мають антирадикальну активність. Показано, що фенольні сполуки (кавова кислота, катехін, галова кислота, нарингін, ферулова кислота, мірицетин, пірогаллол, протокатехінова кислота, гомогентизинова кислота та кверцетин), присутні в плодових тілах свіжих грибів, показали високу активність нейтралізації радикалів DPPH та $O_2^{\cdot-}$.

Мейті та ін. [28] досліджували хімічну активність поглинання вільних радикалів розгалуженим β -D-глюканом (PS-I), отриманим із їстівного гриба *Entoloma lividoalbum*. Автори виявили, що PS-I поглинув $^{\cdot}OH$ і $O_2^{\cdot-}$,

демонструючи значення EC50 480 мкг/мл і 150 мкг/мл відповідно, і гриб також мав відновну здатність і загальну антиоксидантну здатність. Полісахарид MGPS також було виділено з водного екстракту *Meripilus giganteus*, і було виявлено, що він має значну активність поглинання вільних радикалів з точки зору хелатної здатності іонів заліза та $\cdot\text{OH}$ і $\text{O}_2^{\cdot-}$ радикалів.

У відварі їстівного гриба *Lentinus sajor-caju* було виявлено новий антирадикальний агент гетероглікан, який демонструє здатність поглинати радикали DPPH, $\cdot\text{OH}$ і ABTS, а також знижує потужність і здатність хелатувати іони заліза [28].

Паттанаяк та ін. продемонстрували [29], що антиоксидантний гетероглікан із водного екстракту їстівного гриба *Termitomyces clypeatus* (включає (1→3)- α -D-галактопіранозил, (1→3)- α -D-манопіранозил, (1→3)- α -D-глюкопіранозил, (1→3)- β -D-глюкопіранозил, (1→6)- β -D-глюкопіранозил та (1→6)- α -D-галактопіранозил), показали здатність до хелатування іонів заліза та поглинання $\text{O}_2^{\cdot-}$, а також сильну відновну здатність. Полісахариди, отримані шляхом гомогенної екстракції розчинником або екстракції лугом *Pleurotus tuber-regium*, також показали значну хімічну активність поглинання вільних радикалів, яка була пов'язана із загальним вмістом фенолів, оскільки феноли є поглиначами вільних радикалів, завдяки властивій для них здатності пригнічувати пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ).

Також антиоксидантними властивостями володіють вітаміни С, Е, А, D, ерготіонеїн. Вітамін С, також відомий як L-аскорбінова кислота, є основним антиоксидантом у плазмі та клітинах. Це важлива поживна речовина для обмеженої кількості видів тварин, включаючи людей, і тому його необхідно вживати, щоб уникнути потенційно небезпечного стану. Аскорбінова кислота є нормальною складовою шкіри, яка міститься у високих рівнях як у дермі, так і в епідермісі. Проте старіння призводить до зниження вмісту вітаміну С в обох шарах. Надмірний вплив ультрафіолетового світла або забруднюючих речовин також може знизити його вміст, насамперед в епідермісі [30].

Вітамін С виявлено в різних їстівних грибах. Його кількісно визначали за допомогою ВЕРХ або спектрофотометричного аналізу на основі реакції з 2,6-дихлорфеноліндофенолом [4]. Вчені виявили, що в метанольному екстракті дикого їстівного гриба *Cantharellus cibarius* вміст аскорбінової кислоти складає 100 мг/100 г сухої маси (DW). Він був вищим, ніж його вміст у деяких фруктах і овочах, які зазвичай рекомендуються як гарне джерело вітаміну С. Кількість аскорбінової кислоти, знайденої в полуниці, становить 60 мг/100 г, цитрусових 30–50 мг/100 г, тоді як яблука, груші та сливи є лише дуже скромним джерелом аскорбінової кислоти (3–5 мг/100 г).

Основною функцією аскорбінової кислоти є антиоксидантна, за певних обставин вона також може мати прооксидантну дію, зокрема, підтримуючи іони перехідних металів Fe^{3+} і Cu^{2+} у їх відновлених формах. Потім ці іони металів реагують з H_2O_2 , утворюючи високореакційноздатний $\cdot\text{OH}$ у реакції Фентона [31]. Але наразі немає чітких доказів того, що ці реакції мають значення *in vivo*.

У грибах були виявлені α -, β -, γ - і δ -токоферолі, які були ідентифіковані та кількісно визначені. Проте до цього часу токотрієноли не були виявлені в жодному з доступних досліджень. Біологічно найбільш активною формою вітаміну Е є α -токоферол, основна роль якого полягає в захисті клітинних мембран від пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). α -токоферол припиняє активність LPO шляхом поглинання $\text{LOO}\cdot$, але під час цієї реакції сам перетворюється на реакційноздатний радикал.

α -токоферол також може діяти як прооксидант і відновлювати Fe^{3+} або Cu^{2+} . Здатність α -токоферолу діяти як про- або антиоксидант залежить головним чином від його кількості, яка доступна для поглинання АФК. Епідеміологічні дослідження показують, що дієти, багаті фруктами та овочами, знижують рівень раку шлунково-кишкового тракту, але додавання екзогенного вітаміну Е та інших антиоксидантів (β -каротин, вітаміни А, С і Se) не запобігає раку шлунково-кишкового тракту. У деяких випадках вітамін Е підвищує ризик раку [32]. Подібним чином було показано, що додавання

вітаміну Е значно прискорює прогресування раку легенів і знижує рівень виживаності на моделях мишей [33]. Оскільки експресія генів ендogenous антиоксидантів знижується введенням антиоксидантних добавок, профіль транскриптоми пухлини змінюється, знижується рівень експресії p53 (ген супресора пухлини) відповідно. Ці зміни пояснюють, чому антиоксиданти можуть сприяти розвитку раку.

Кількість токоферолів, виявлена в їстівних грибах, була набагато нижчою, ніж у деяких продуктах харчування, які зазвичай рекомендуються як джерело вітаміну Е. У порівнянні з продуктами з високим вмістом вітаміну Е, наприклад, мигдалем (26,2 мг/100 г), смаженим насінням соняшнику (36,3 мг/100 г), авокадо (2,1 мг/100 г), тофу (5,3 мг/100 г), креветками (2,2 мг/100 г) та ін., вміст токоферолів у їстівних грибах становить від 0,02 до 200 мкг/100 г сухої речовини.

Каротиноїди є природними пігментами, в раціоні людини представлені β -каротином, α -каротином, лікопіном, лютеїном і β -криптоксантином, з яких β -каротин, α -каротин і β -криптоксантин здатні функціонувати як провітамін А і відіграють важливу роль як харчові джерела вітаміну А [34]. Останнім часом інтерес до каротиноїдів був зосереджений на ролі лікопіну в здоров'ї людини. Він не має властивостей провітаміну А. Через ненасичену природу лікопіну вважається потужним антиоксидантом. Показано, що лікопін проникає через гематоенцефалічний бар'єр і присутній у центральній нервовій системі в низьких концентраціях. Повідомлялося про значне зниження рівня лікопіну у пацієнтів із хворобою Паркінсона та судинною деменцією [34].

Зокрема, β -каротин і лютеїн були виявлені в кількох видах грибів. Каротиноїди, знайдені в рожево-червоному *Cantharellus cinnabarinus* і помаранчевому *Cantharellus friesii*, майже повністю складаються з кантаксантина, пігменту, який також міститься в лососі. Це може пояснити використання лисичок китайськими травниками для лікування курячої сліпоти [4]. Повідомляється, що кантаксантин захищає тканини людини від окисного пошкодження та продається як антиоксидант.

Каротиноїди можуть реагувати з АФК і самі ставати радикалами. Вони функціонують як антиоксиданти, що розривають ланцюг, у ліпідному середовищі, особливо за низького парціального тиску кисню. Реакційна здатність каротиноїдів залежить від довжини ланцюга і характеристик кінцевих груп [31]. Радикали каротиноїдів є стабільними завдяки делокалізації неспареного електрона над спряженим полієновим ланцюгом молекул. Каротиноїдні радикали є дуже короткоживучими сполуками.

Антиоксидантні властивості каротиноїдів можуть бути змінені на прооксидантні в залежності від тиску кисню або концентрації каротиноїдів. Встановлено, що β -каротин втрачає свою антиоксидантну активність при підвищенні нормального тиску кисню в навколишньому середовищі та має автокаталітичний прооксидантний ефект, який посилюється з підвищенням його концентрації [36]. Дослідження харчових добавок із високими дозами β -каротину у курців показали підвищення ризику раку, можливо, через те, що β -каротин під час інтенсивного окиснювального стресу (наприклад, спричиненого інтенсивним палінням) утворює продукти розпаду, які знижують вміст вітаміну А в плазмі та погіршують стан легень [40]. Часте використання вітаміну С і вітаміну Е в період після діагностики раку молочної залози асоціювалося зі зниженою ймовірністю рецидиву, тоді як часте використання комбінації каротиноїдів асоціювалося зі збільшенням смертності.

Для людини найважливішими сполуками, які належать до вітамінів групи D, є вітамін D3, також відомий як холекальциферол, і вітамін D2, або ергокальциферол. І холекальциферол, і ергокальциферол самі по собі неактивні, але метаболізуються в печінці до 25-гідроксивітаміну D і далі в нирках до біологічно активної форми, 1,25-дигідроксивітаміну D. Вітамін D3 походить із тваринних джерел, а вітамін D2 – переважно з грибів і дріжджів [36]. Вміст вітаміну D2 у грибах, культивованих або зібраних у дикому вигляді, відрізняється. Різниця в кліматі, середовищі існування та широті може спричинити варіації у вмісті ергокальциферолу в грибах. Наприклад, вміст

лише 0–3,75 мкг/100 г свіжої ваги було виявлено в *A. bisporus* і від 0,04 до 21,8–109,6 мкг/100 г сухої речовини у *L. edodes*.

Вміст вітаміну D2 у грибах можна значно збільшити за допомогою ультрафіолетового опромінення, у результаті чого він утворюється з ергостеролу, який присутній у великих кількостях [37]. Вчені показали, що ергокальциферол добре засвоюється людьми з ліофілізованих і гомогенізованих дикорослих їстівних грибів.

Вітамін D3 і D2, його активний метаболіт 1,25-дигідроксихолекальциферол, а також 7-дегідрохолестерин (провітамін D3) є мембранними антиоксидантами, вони інгібують заліозалежне окислення ліпосомальних ліпідів. Структурна основа антиоксидантної здатності цих сполук вітаміну D розглядається з точки зору їх молекулярного зв'язку з холестеролом і ергостеролом.

Біологічно активний 1,25-дигідроксिवітамін D зв'язується з рецептором вітаміну D на клітинах і відіграє роль не тільки в поглинанні Ca^{2+} , але й у диференціації клітин [37]. Крім того, завдяки зниженню плинності мембрани за рахунок мембранної взаємодії, яка, як вважається, призводить до спостережуваного інгібування залежного від заліза ліпосомального окисного окислення ліпідів, вітамін D може пригнічувати ріст ракових клітин (особливо метастатичних клітин), які часто мають підвищений рівень плинності мембрани порівняно з нормальними клітинами.

Ерготіонеїн (ЕТ) – незвичайне сірковмісне похідне амінокислоти гістидину, яка надходять виключно з їжею. Нещодавно було ідентифіковано високоспецифічний транспортер для ЕТ, ЕТТ (інтегральний мембранний білок, OTCN1) у тканинах ссавців, що пояснює значні рівні ЕТ у тканинах і передбачає його фізіологічну роль [38]. Клітини, у яких відсутній ЕТТ, більш сприйнятливі до окиснювального стресу, що призводить до збільшення пошкодження мітохондріальної ДНК, окислення білків і окисного ушкодження ліпідів. ЕТ концентрується в мітохондріях, що свідчить про особливу роль у захисті мітохондріальних компонентів, таких як ДНК, від

окисного пошкодження. Через його дієтичне походження та токсичність, пов'язану з його виснаженням, ЕТ може представляти нову біологічно активну сполуку, фізіологічна роль якої включає антиоксидантний захист [38]. Гриби є основним джерелом ЕТ, що містить від 400 до 2500 мг/г сирої маси.

Аналіз плодових тіл та міцелію 29 видів їстівних і лікарських грибів підтвердив наявність ЕТ у всіх зразках. Найбільшу кількість виявили серед плодових тіл їстівних видів *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus* (Корея), *P. ostreatus* (Тайвань) та *P. salmoneostramineus* (2850,7, 1829,4, 1458,4 та 1245,0 мг/кг відповідно), тоді як у міцелії *P. eryngii* містилася найбільша його кількість (1514,6 мг/кг). Також було виявлено, що вміст ЕТ у *P. ostreatus* був найвищим (2590 мг/кг сухої ваги).

Таким чином, багато досліджень продемонстрували хімічну здатність грибів поглинати вільні радикали в різних хімічних аналізах, такі як DPPH або FRAP з використанням хімічних речовин. Дослідження здатності хімічного поглинання вільних радикалів обмежені, оскільки вони не можуть імітувати взаємодію фітосполуки з усіма хімічними речовинами та типами клітин, що знаходяться в складному організмі [39]. Отже, подальші експерименти *in vivo*/фармакологічні аналізи можуть підтвердити їх антиоксидантну активність шляхом тестування на моделях гризунів.

2.4. Антиоксидантний потенціал грибів *in vivo*

Ринок антиоксидантів за типом продукту сегментований на природні антиоксиданти та синтетичні антиоксиданти. Природні антиоксиданти поділяються на рослинні та грибні екстракти, спеції (розмарин, чебрець, майоран, орегано, шавлія, базилік, перець, гвоздика, кориця та мускатний горіх), флавоноїди, убіхінол (повністю відновлена форма коензиму Q₁₀), глутатіон, цинк (Zn), селен (Se), вітамін А (включаючи каротиноїди), вітамін С і вітамін Е (включаючи токофероли і токотрієноли) [40].

Синтетичні фенольні антиоксиданти включають бутильований гідроксіанізол (ВНА), бутильований гідрокситолуол (ВНТ) та інші, наприклад,

пропілгаллат, трет-бутилгідрокінон (TBHQ), етоксихін (EQ), які ефективно інгібують окислення [15]. Однак деякі синтетичні антиоксиданти можуть викликати несприятливі токсичні ефекти за певних умов. ВНА, який дуже часто використовується як добавка в харчовій промисловості, може мати негативний вплив на регуляцію активності мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК) залежно від дозування. Тому лише кілька синтетичних антиоксидантів дозволено використовувати як кормові добавки в Європейському Союзі. В останні роки обмеження використання синтетичних антиоксидантів, таких як ВНА і ВНТ, викликало стрімке зростання інтересу до природних антиоксидантних речовин. Найбільше природних альтернативних джерел антиоксидантів потребують люди.

На сьогодні їстівні гриби привернули увагу як комерційне джерело антиоксидантів [41]. Їх можна використовувати безпосередньо для посилення антиоксидантного захисту за допомогою харчових добавок для зниження рівня окиснювального стресу. Існує велика кількість доказів на підтримку ефективності такої стратегії *in vitro*.

Тести *in vitro* та моделі діабету на тваринах свідчать про те, що антиоксиданти підвищують чутливість до інсуліну та можуть полегшити ускладнення, спричинені резистентністю до інсуліну при цукровому діабеті. Вчені показали, що етаноловому екстракту *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. вдалося зменшити гіперглікемію, спричинену стрептозотоцином, у високій дозі (300 мг/кг). Проте у біохімічних тестах лікування високими дозами екстрактів *F. pinicola* підвищило рівень ліпопротеїну високої щільності (HDL-C) і знизило загальний холестерол (TC) та триацилгліцероли (TG). Подібним чином вдалося провести лікування екстрактом *F. Pinicola* для захисту тканин органів від окислювального стресу шляхом відновлення рівнів ферментів каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD) і глутатіонпероксидаза (GSH-Px). Численні дослідження показали, що лікування біологічно активними сполуками грибів має терапевтичний ефект у лікуванні цукрового діабету та його ускладнень.

Дослідження *in vivo* доводять, що екстракти грибів і виділені з них сполуки здатні підвищувати активність ферментативних антиоксидантів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонредуктаза, які беруть участь у видаленні шкідливих активних форм кисню [42].

Деякі вчені підтверджують антиоксидантну активність полісахаридів *G. lucidum* (GLP), які в результаті взаємодії атома водню з радикалами розривають радикальні ланцюгові реакції і, таким чином, знижують рівні ліпопероксидації та малонового діальдегіду.

Різнманітні дослідження щодо антиоксидантних властивостей грибних полісахаридів вказують на їх функціонування як потужних антиоксидантів, які запобігають опосередкованій радикалами токсичності та, зрештою, захищають тканини від АФК та інших вільних радикалів.

Найважливішим класом грибних полісахаридів з антиоксидантною активністю є β -D-глюкани. β -D-глюкани можуть бути ефективними для людей у відновленні імунної системи, а також у боротьбі з цукровим діабетом, раком та інфекційними захворюваннями [43]. Різнманітні інші фармакологічні сполуки, отримані з грибних полісахаридів, включаючи шизофіллан, лентинан, грифолан, полісахаридний пептидний комплекс (PSP) і полісахаридно-білковий комплекс (PSK), продемонстрували терапевтичні переваги в лікуванні цукрового діабету, а також продемонстрували свою антиоксидантну здатність.

Незважаючи на їх очевидні переваги як антиоксидантів (полісахариди грибів), необхідне більш повне дослідження та оцінка ефективності та безпеки даного підходу до лікування.

3. Гриби роду *Hericium* як перспективні джерела біологічно активних сполук

Гриби здавна відомі своїм смаковими та лікувальними властивостями. Гриби містять у собі високу частку білків, полісахаридів, ліпополісахаридів та

глікопротеїнів, а також виробляють і накопичують низькомолекулярні вторинні метаболіти, тому вважаються цінним продуктом для людей.

Особливу увагу привертають гриби роду *Hericium*, широко відомі своїми лікарськими і смаковими властивостями їстівні гриби. Це цілком безпечні гриби при вживанні і навіть при передозуванні не несуть смертельних наслідків. Гриби зустрічаються досить рідко і внесені до Червоних книг країн Європи [44]. Інформації щодо вирощування *Hericium* у промислових масштабах України наразі немає, проте відомо, що він культивується в багатьох країнах, зокрема, в Південно-Східній Азії (Китай і Японія), Європі, Північній Америці та інших країнах [44].

В природних умовах *H. erinaceus* зустрічається в Південно-Східній Азії (Китай і Японія), Європі, Північній Америці, спричиняє білу гниль деревини, є переважно сапротрофом, але іноді може паразитувати на ослаблених деревах. В Східній Європі гриби часто зустрічаються в природних місцях існування і включений до Червоних списків багатьох європейських країн, він є кандидатом на включення до Червоної книги України.

H. erinaceus можна культивувати у великих масштабах з використанням недорогих субстратів, таких як штучні та сільськогосподарські відходи. Комерційне вирощування цього виду поширене в усьому світі, особливо в Азії та США. Завдяки своїм корисним властивостям цей гриб широко використовується в харчуванні країн Східної Азії. У традиційній китайській і японській медицині гриб левиної гриви століттями використовувався як засіб від шлунково-кишкових розладів, хвороб печінки та нирок, селезінки та серця. Корінні американці в Північній Америці також використовували його як профілактичний засіб проти кровотеч.

Сучасні відомості щодо лікувальних властивостей *H. erinaceus* свідчать про широкий біологічний спектр його дії. Численні літературні дослідження останніх десятиліть присвячені біоактивним сполукам, виділеним з його плодових тіл та міцелію, зібрана інформація щодо близько 70 вторинних метаболітів для запобігання або лікування неврологічних захворювань

людини. Також відомо, що плодові тіла *Hericium erinaceus* збагачені білками, полісахаридами, ліпополісахаридами, глікопротеїнами ненасиченими жирними кислотами, фенолами, терпенами, преніловими ароматичними компонентами, вітамінами B₁ та B₂, нікотиною кислотою, ергостеролом (провітамін D₂), крім цього містить в собі 16 видів амінокислот (з них сім незамінних) та різноманітні мікроелементи.

Міцелій *H. erinaceus* містить в своєму складі гериценони і еринацини, що є стимуляторами росту та регенерації відростків нервових клітин, а тому можуть бути використані як агенти для розробки антикогнітивних препаратів проти розладів, неврологічних захворювань, таких як хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера.

Як показано у роботі автора Мірошніченка [45] на сьогоднішній день для лікування деменції (зокрема хвороби Альцгеймера) використовують продукт, заснований на стандартизованому екстракті, що містить герициніони і амілобан (обидва компонента з гриба *H. erinaceus*). *Hericium erinaceus* збагачений полісахаридами, такими як ксилан, глюксоксиан, манноксилан, ізоксилоглюкан і галактоксилоглюкан, які складаються з β -D-глюкану, який може посилювати ріст Т-клітин і макрофагів, цим самим сприяючи підвищенню імунітету. Полісахариди, феноли та ліпополісахариди проявляють антиоксидантні властивості та захищають організм від вільних радикалів, які можуть сприяти розвитку багатьох хвороб таких як рак, хвороба Альцгеймера, серцево-судинні захворювання, а також прискорюють процес старіння. Зазначено, що етиловий екстракт та етилацетат *Hericium erinaceus* може *in vitro* пригнічувати ріст *Helicobacter pylori*, захищаючи таким чином шлунок від гастриту, виразки і навіть раку. Вживання цього гриба позитивно впливає на серцево-судинну систему, знижуючи рівень холестерину в крові, запобігаючи агрегації тромбоцитів, допомагаючи уникнути тромбозів, серцевих захворювань та інсульту, а також лікуючи та запобігаючи ожирінню та діабету, покращуючи обмін речовин і знижуючи рівень цукру в крові [46].

II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Приготування етанольного екстракту плодових тіл грибів *Hericium alpestris*, *Hericium erinaceus*

Екстракцію проводили згідно з методом, запропонованим у Boonsong et al. [47] з деякими змінами. Для приготування 70% (об./об.) етанольного екстракту кожен порошкоподібний зразок (5 г) змішували з 50 мл 70% (об./об.) етанолу і струшували при 150 об/хв при кімнатній температурі протягом 24 годин; потім його центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Ватман і збирали фільтрат. Залишок повторно екстрагували за тих же умов. Отриманий екстракт концентрували під вакуумом при 40 °С на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Отриманий зразок зберігався в темному місці при 4 °С.

Для визначення антиоксидантної активності готували екстракти з концентрацією 0,05, 0,10, 0,15, 0,25, 0,5 мг/мл.

Визначення загальної антиоксидантної активності фосфомолібденовим методом

Аліквоту екстрактів різної концентрації (0,3 мл) змішували з 3 мл розчину реагенту (0,6 М сірчаної кислоти, 28 мМ фосфату натрію та 4мМ молібдату амонію). Суміш інкубували при 95 °С протягом 90 хв. Потім суміш охолоджували до 25 °С і вимірювали поглинання при довжині хвилі 695 нм проти контрольного зразка, що містив 3 мл розчину реагенту без зразка.

Розрахунки проводили за формулою:

$$N = (A_0 - A_1) / A_0, \text{ де } A_0 - \text{контроль, } A_1 - \text{зразок.}$$

Високе значення оптичної густини свідчить про високу антиоксидантну активність зразка [48]. Аскорбінову кислоту використовували як стандарт.

Оцінка активності поглинання радикалів DPPH

1,5 мл екстрактів різної концентрації вносили до 1,5 мл 100 мкМ DPPH в етанолі. Реакційну суміш струшували протягом однієї хвилини та інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хвилин. Потім

виміряли його оптичну густину при довжині хвилі 517 нм. Етанол використовували як порожній зразок, а аскорбінову кислоту – як позитивний контроль (референтний стандарт) [48]. Інгібування радикалів DPPH у відсотках розраховували наступним чином:

Інгібування DPPH (%) = $(OD_{DPPH} - OD_{\text{зразок}+DPPH}) / OD_{DPPH} \times 100$, де OD_{DPPH} – контроль, $OD_{\text{зразок}+DPPH}$ – зразок.

Визначення відновної здатності шляхом відновлення фериціанідного комплексу

Аналіз відновної здатності проводили за допомогою методу, описаного Ouyazi з кількома модифікаціями [49]. До 100 мкл екстракту різної концентрації (від 0,05 до 0,5 мг/мл) додавали 1,0 мл дистильованої води, змішували з фосфатним буфером (2,5 мл, 0,2 М, рН 6,6) і 1% фериціанідом калію (2,5 мл). Суміш інкубували при 50 °С протягом 20 хвилин. До суміші додавали аліквоти трихлороцтової кислоти (2,5 мл, 10 %). Верхній шар розчину (2,5 мл) змішували з дистильованою водою (2,5 мл) і 0,3 мл, 0,1 % $FeCl_3$. Оптичну густину зразків вимірювали при 700 нм. Підвищення поглинання реакційної суміші свідчить про збільшення відновної здатності. Як стандарт використовували аскорбінову кислоту.

Амінокислотний аналіз

Для аналізу вмісту амінокислот (АК) зразки гідролізували в 6 N хлоридній кислоті у вакуумно-герметичних пробірках при 106 °С протягом 24 годин. Вміст АК у різних гідролізатах визначали за допомогою автоматичного аналізатора Т-339 (Microtechnology, Чехія, на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) з постколонковою дериватизацією за допомогою нінгідрину. Концентрації амінокислот (у г/100 г білків) розраховували із зовнішніх стандартів для різних амінокислот. Результати обробляли за допомогою програми Statistica 8.0. Усі експерименти проводили з використанням трьох біологічних повторів. Усі значення є середніми $\pm$ SD (n = 3) [50].

III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гриби є цінним джерелом поживних речовин, тому їх вивченню приділяють дуже велику увагу. Вони володіють приємним смаком, корисним властивостям для здоров'я і високою харчовою цінністю, оскільки містять багато білків [51]. Також відомо, що гриби містять багато антиоксидантних сполук: поліфеноли, флавоноїди, полісахариди, вітаміни С та Е. Для визначення антиоксидантної активності спиртових екстрактів плодових тіл грибів використовують низку методів. Ці методи відрізняються за принципом аналізу, умовами експерименту та механізмом реакції. Найбільш ефективними, доступними та швидкими є методи визначення загальної антиоксидантної активності фосфоромолібденовим методом, оцінка поглинання радикалів DPPH, визначення відновної здатності шляхом відновлення фериціанідного комплексу.

Оцінка активності поглинання радикалів DPPH

Для визначення антиоксидантної активності проводили аналіз активності поглинання радикалів DPPH (1,1-дифеніл-2-пікрілгідразил) етанольними екстрактами досліджуваних грибів у концентраціях: 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,5 мг/мл. DPPH є стабільним вільним радикалом і здатний приймати електрон, взаємодіючи з антиоксидантами, перетворюючись при цьому у стабільну діаманітну молекулу. Здатність до відновлення радикалів DPPH визначають за зниженням його поглинання при 517 нм у присутності антиоксидантів. Як стандарт використовували аскорбінову кислоту.

Результати проведених досліджень показали, що у межах концентрацій 0,05 – 0,15 мг/мл активність поглинання радикалів DPPH спиртовими екстрактами грибів *Hericium alpestris* і *Hericium erinaceus* достовірно не відрізняється (рис. 1). Проте антиоксидантна активність екстракту *Hericium alpestris* у концентрації 0,25 мг/мл перевищує антиоксидантну активність спиртового екстракту *Hericium erinaceus*, досягаючи максимальних значень за

концентрації 0,5 мг/мл, що відображено на рис. 1.

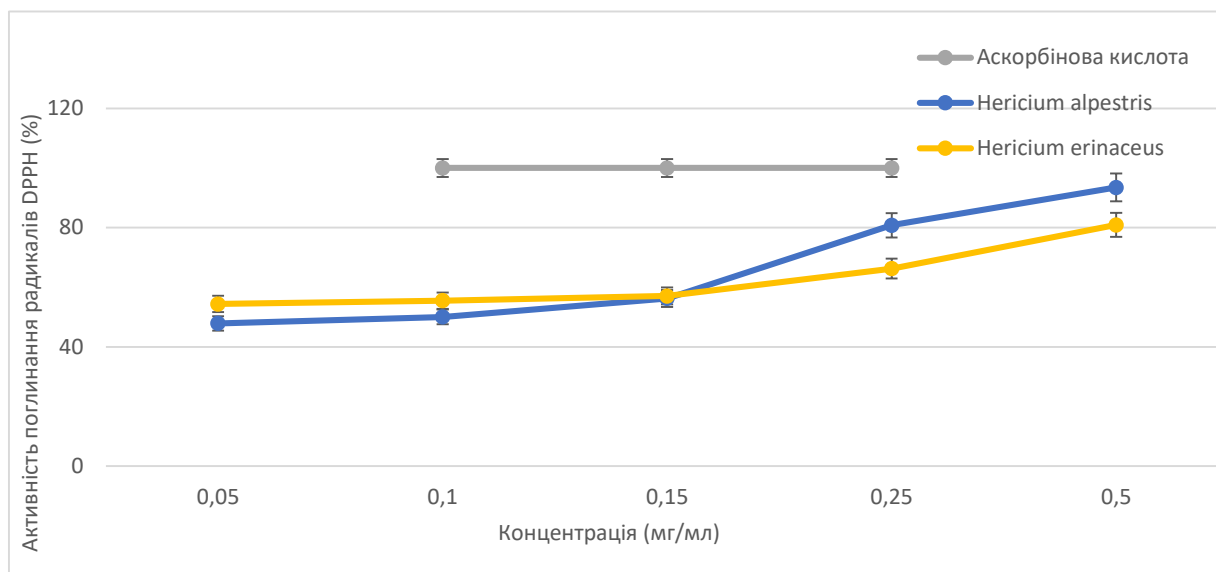


Рис 1. Активність поглинання радикалів DPPH плодових тіл грибів видів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*

Виходячи з даних результатів можна зазначити, що поглинальні ефекти етанольних екстрактів із досліджуваних видів грибів щодо радикалів DPPH зростають із збільшенням їх концентрації. Отже, отримані результати свідчать про високий антиоксидантний потенціал спиртових екстрактів обох досліджуваних грибів, проте максимальною здатністю поглинати радикали DPPH володіє екстракт *Hericium alpestris*.

Загальна антиоксидантна активність (фосфомолібденовий метод)

Метод визначення загальної антиоксидантної активності базується на відновленні Мо (VI) до Мо (V) у присутності антиоксидантів та подальшому утворенні комплексу зеленого кольору фосфат/Мо (V) при кислому рН з максимальним спектром поглинання при довжині хвилі 695 нм. Загальну антиоксидантну активність спиртових екстрактів плодових тіл грибів порівнювали з еталонним стандартом аскорбінової кислоти.

Високі значення поглинання вказують на те, що екстракти плодових тіл *H. erinaceus* та *H. alpestris* володіють високою антиоксидантною активністю. На рис. 2 показано, що при концентраціях від 0,05 – 0,15 мг/мл вищу антиоксидантну активність виявляють спиртові екстракти плодових тіл

Hericum alpestris. Проте при збільшенні концентрації від 0,25 – 0,5 мг/мл показники антиоксидантної активності підвищуються, однак між спиртовими екстрактами плодових тіл грибів видів *Hericum alpestris* та *Hericum erinaceus* достовірної різниці не спостерігається.

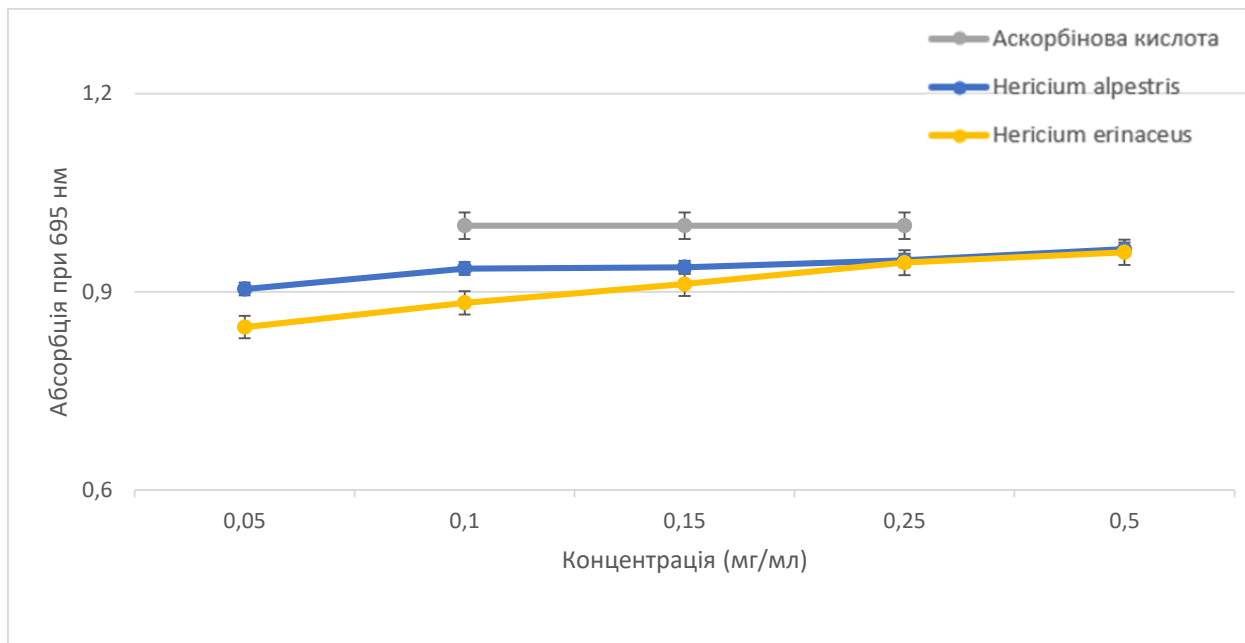


Рис. 2. Загальна антиоксидантна активність спиртових екстрактів плодових тіл грибів видів *Hericum alpestris* та *Hericum erinaceus*

Результати показали, що екстракти мають високу антиоксидантну активність, і ефекти посилюються зі збільшенням їх концентрації.

Визначення відновної здатності шляхом відновлення фериціанідного комплексу

Як важливий показник антиоксидантної активності розглядають відновлюючу здатність сполук. Присутність відновників, зокрема, антиоксидантних речовин у зразках, викликає відновлення комплексу Fe^{3+} /фериціанід до Fe^{2+} , шляхом віддачі електрона.

На рис. 3 показано відновну здатність фериціанідного комплексу в спиртових екстрактах плодових тіл грибів видів *Hericum alpestris* та *Hericum erinaceus*, які в порівнянні з аскорбіновою кислотою показали нижчі результати. Проте обидва екстракти продемонстрували майже однакову

помірну відновну здатність, яка зростала зі збільшенням концентрації екстрактів. Однак *Hericium alpestris* володіє вищою абсорбцією, що свідчить про вищу відновну здатність у порівнянні з *Hericium erinaceus*.

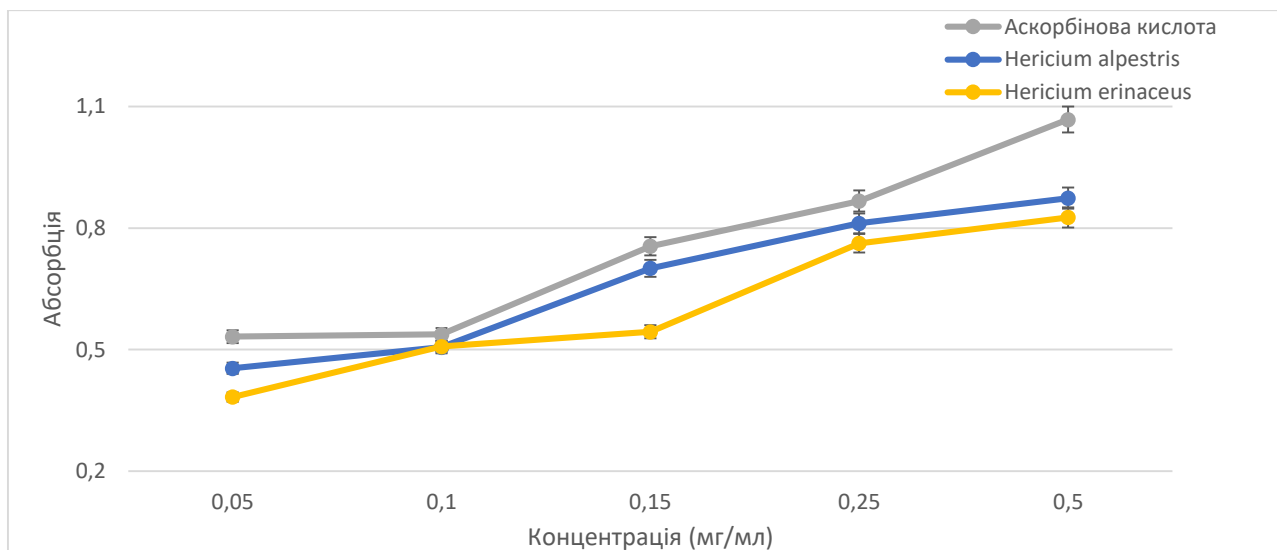


Рис. 3. Відновна здатність фериціанідного комплексу в спиртових екстрактах плодових тіл грибів видів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*

Амінокислотний аналіз

Відомо, що харчова цінність грибів залежить від їх амінокислотного складу. Різні типи амінокислот впливають на смак та аромат грибів. Гриби, які містять більше аланіну, гліцину, серину і треоніну, є солодкими та мають приємний аромат. Проте, якщо переважають аргінін, лейцин, ізолейцин, гістидин, метіонін, фенілаланін і валін – гриби гіркі. Погані смакові якості у грибів з переважанням лізину і тирозину [52]. Крім харчової цінності, гриби є джерелом дев'яти незамінних амінокислот (гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін), які організм не синтезує самостійно. Відомо, що харчова цінність грибів залежить від їх амінокислотного складу. В Таблиці 1 показано амінокислотний профіль двох видів грибів *H. erinaceus* та *H. alpestris* у г/100 г білка. Аналіз *H. erinaceus* був проведений раніше, результати опубліковані у статті [50]. Нами встановлено, що загальний вміст амінокислот у гриба *H. alpestris* вищий за *H. erinaceus*.

Показано, що вміст лізину, проліну, валіну, ізолейцину та лейцину у досліджуваних зразках грибів достовірно не відрізняється (Табл. 1).

При цьому вміст гістидину, аргініну, треоніну, серину, тирозину, фенілаланіну, ГАМК, аспаргінової та глутамінової кислот практично вдвічі перевищує вміст цих амінокислот у плодових тілах гриба *H. erinaceus*.

Таблиця 1. Амінокислотний склад грибів видів
Hericum alpestris та *Hericum erinaceus*

Амінокислоти	Гриби	
	<i>Hericum alpestris</i>	<i>Hericum erinaceus</i> [50]
Лізін*	0.26±0.028 ^a	0.22±0.011 ^a
Гістидин*	0.11±0.063 ^a	0.06±0.002 ^b
Аргінін	0.29±0.001 ^a	0.14±0.019 ^b
Аспаргінова кислота	0.65±0.099 ^a	0.37±0.044 ^b
Треонін*	0.28±0.056 ^a	0.14±0.023 ^b
Серин	0.33±0.007 ^a	0.15±0.037 ^b
Глутамінова кислота	0.90±0.079 ^a	0.53±0.071 ^b
Пролін	0.23±0.002 ^a	0.27±0.012 ^a
Гліцин	0.26±0.072 ^a	0.18±0.017 ^b
Аланін	0.37±0.049 ^a	0.24±0.031 ^b
Цистеїн	0.04±0.001 ^b	0.07±0.009 ^a
Валін*	0.17±0.055 ^a	0.17±0.041 ^a
Метіонін*	0.04±0.016 ^b	0.09±0.005 ^a
Ізолейцин*	0.90±0.051 ^a	0.77±0.066 ^a

Амінокислоти	Гриби	
	<i>Hericium alpestris</i>	<i>Hericium erinaceus</i> [50]
Лейцин*	0.36±0.099 ^a	0.31±0.014 ^a
Тирозин	0.15±0.051 ^a	0.09±0.011 ^b
Фенілаланін*	0.23±0.002 ^a	0.16±0.012 ^b
Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК)	0.17±0.066 ^a	0.09±0.011 ^b
ЗАА, загальна кількість амінокислот	5.82	4.06
НАА/ЗАА	40.97 %	47.30 %
ГАА/ЗАА	59.02 %	49.50 %

Усі значення є середніми ± SD трьох визначень (у г/100 г білка). Значення, позначені різними літерами, достовірно відрізняються ($P < 0,05$).

*Незамінні амінокислоти (НАА); ЗАА, загальна кількість амінокислот; ГАА, гідрофобні амінокислоти. Амінокислотний склад *Hericium erinaceus* були наведені в джерелі [50].

Цікаво, що вміст сульфуровмісних амінокислот – цистеїну та метіоніну – у плодових тілах *H. alpestris* достовірно нижчий порівняно з *H. erinaceus*. Окрім того, у *H. alpestris* вища частка гідрофобних амінокислот та нижчий вміст сумарних незамінних амінокислот порівняно з *H. erinaceus*.

Отже, спиртові екстракти плодових тіл *H. alpestris* володіють вищим антиоксидантним потенціалом; їх плодові тіла містять більшу частку гідрофобних амінокислот, нижчий вміст незамінних амінокислот та збіднені на сульфуровмісні амінокислоти порівняно з *H. erinaceus*.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що зі зростанням концентрації спиртових екстрактів плодових тіл *H. erinaceus* та *H. alpestris* їх антиоксидантний потенціал зростає. Показано, що у концентрації 0,05-0,15 мг/мл антиоксидантна активність спиртових екстрактів плодових тіл грибів суттєво не відрізняється, проте у межах концентрацій 0,25-0,5 мг/мл *H. alpestris* проявляє вищу здатність поглинати радикали DPPH та володіє більшою відновною здатністю.

2. Показано, що амінокислотний склад *H. alpestris* відрізняється від *H. erinaceus*. Вміст амінокислот у *H. alpestris* вищий порівняно з *H. erinaceus*, при цьому їх плодові тіла містять більшу частку гідрофобних амінокислот, нижчий вміст незамінних амінокислот та збіднені на сульфуровмісні амінокислоти порівняно з *H. erinaceus*.