

Биоконверсия вегетативной части топинамбура микро- и макроскопическими грибами

Т.В. Рязанова^а, Н.А. Чупрова^б, Ю.А. Литовка^с

Сибирский государственный технологический университет, пр. Мира 82, Красноярск, Россия

atatyana-htd09@mail.ru, ^бlitovkajul@rambler.ru, ^сhtdandbt@mail.ru

Статья поступила 18.01.2016, принята 25.02.2016

*Исследовано воздействие ферментного комплекса микро- и макроскопических грибов на вегетативную часть топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). Установлено наличие общей фенолоксидазной активности у представителей *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola*. Оценка ростовых характеристик позволила выделить наиболее перспективные для биоконверсии штаммы: M99/9 *Trichoderma asperellum*, T1 *Trichoderma* sp., Tv-06 *Trametes versicolor* и Kx1n *Fusarium sporotrichioides*, имеющие одинаковую радиальную скорость роста (11,3 мм/сут). По характеру воздействия на субстрат исследуемые штаммы можно разделить на две группы. Штаммы первой группы — *Trametes versicolor* Tv-06, *Pleurotus ostreatus* Po-1, *Trichoderma* T1 и M 99/9 обладают сравнительно большой лигнолитической и целлюлазной активностью. Количество лигнина и полисахаридов в процессе культивирования этих штаммов снижается в 1,5–1,9 раза. Вторая группа — грибы рода *Fusarium*. Они обладают меньшей лигнолитической и целлюлазной активностью, о чем свидетельствует изменение содержания лигнина в субстрате на 11,7–16,5 % и полисахаридов на 7,3–18,9 %. В этой группе существенные изменения наблюдаются в содержании водорастворимых веществ сахарной природы. С учетом ростовых характеристик и влияния воздействия исследуемых культур на растительный субстрат наиболее перспективным в практическом отношении является штамм M 99/9 *Trichoderma asperellum*. Показано, что при ферментации вегетативной части топинамбура этим штаммом происходит снижение содержания углеводов и лигнина в субстрате наряду с увеличением количества водорастворимых, белковых веществ и липидов.*

Ключевые слова: вегетативная часть топинамбура; биодеструкция; микромицеты; макромицеты; *Trichoderma*; *Fusarium*; *Pleurotus ostreatus*; *Trametes versicolor*; *Lentinus edodes*; *Piptoporus betulinus*; *Fomitopsis pinicola*.

Bioconversion of a vegetative part of *Helianthus tuberosus* by micro- and macroscopic fungi

T.V. Ryazanova^а, N.A. Chuprova^б, Yu.A. Litovka^с

Siberian State Technological University; 82, Mira St., Krasnoyarsk, Russia

^аtatyana-htd09@mail.ru, ^бlitovkajul@rambler.ru, ^сhtdandbt@mail.ru

Received 18.01.2016, accepted 25.02.2016

*The aim of this research is to study of the solid-phase cultivation of micro - and macroscopic fungi on the vegetative part of *Helianthus tuberosus* and their enzyme activity. Strains of fungi were grown on malt extract agar with tannin to detect phenol oxidase activity. Micromycetes *Trichoderma*, *Fusarium* and macromycetes *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Piptoporus betulinus* and *Fomitopsis pinicola* have enzymatic activity. Screening of the most active strains was performed using growth characteristics and parameters of *Helianthus tuberosus* bioconversion. Strains M99/9 *Trichoderma asperellum*, T1 *Trichoderma* sp., Tv-06 *Trametes versicolor* and Kx1n *Fusarium sporotrichioides* have the same radial rate of growth on substrate (11.3 mm / day). All investigated strains were divided into two groups according to the degree of bioconversion vegetative part of *Helianthus tuberosus*. The first group - strains *Trametes versicolor* Tv-06, *Pleurotus ostreatus* Po-1, *Trichoderma* T1 and M 99/9. They have a high lignolitic and cellulase activity: the amount of polysaccharides and lignin in the substrate after the bioconversion is reduced by 1.5 - 1.9 times. The second group - fungi of the genus *Fusarium*. They have less lignolitic and cellulase activity: the amount of lignin decreased by 11,7-16,5%; polysaccharide content decreased by 7,3-18,9 %. *Fusarium* species significantly modify the content of water-soluble substances of sugar nature. Strain M 99/9 *Trichoderma asperellum* is the most promising for practical use, taking into account the growth performance and biochemical characteristics of the substrate before and after the bioconversion. The solid- phase culturing this strain on the vegetative part of *Helianthus tuberosus* leads to a significant reduction of carbohydrates and lignin content and increased number of water-soluble substances, proteins and lipids.*

Key word: vegetative part of *Helianthus tuberosus*; biodegradation; micromycetes; macromycetes; *Trichoderma*; *Fusarium*; *Pleurotus ostreatus*; *Trametes versicolor*; *Lentinus edodes*; *Piptoporus betulinus*; *Fomitopsis pinicola*.

Введение

Лигноцеллюлозные растительные отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности являются доминирующим видом потенциального растительного сырья для микробиологической конверсии. При использовании биологических агентов растительные отходы могут быть переработаны в ценные целевые продукты с одновременным снижением темпов загрязнения окружающей среды.

Способность микроорганизмов разрушать лигноцеллюлозный комплекс растительных отходов неодинакова по длительности процесса и степени воздействия на структуру комплекса. Одними из перспективных биологических агентов, продуцирующих лигнолитические и целлюлолитические ферменты, являются микро- и макроскопические грибы, способность к биодеструкции которых зависит от биологических особенностей штаммов, условий культивирования, состава и предварительной обработки сырья, типа биореактора и т. д. [1–5]. Твердофазная ферментация, предусматривающая прямую деградацию лигноцеллюлозных материалов, может быть одним из наиболее эффективных и рентабельных методов биоконверсии при использовании высокоактивных штаммов, адаптированных к конкретному ростовому субстрату, но процесс биодеструкции целлюлозы и лигнина протекает неодинаково.

Способность грибов осуществлять глубокое разрушение лигнина представляет собой уникальное явление. Наиболее активные группы микроорганизмов, вызывающие разрушение лигнина, принадлежат к дереворазрушающим базидиомицетам, вызывающим белую гниль [6–10]. Однако все стадии ферментативных реакций, протекающих при разложении лигнина, до настоящего времени не известны полностью.

Способностью к разложению и усвоению лигнина обладают также микромицеты, как, например, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* [8–9]. Своеобразное химическое строение лигнина делает его труднодоступным для ферментных систем микроорганизмов. Большинство микроорганизмов, воздействующих на лигнин, вызывают в нем незначительные изменения, которые приводят в основном к уменьшению содержания метоксильных групп и небольшой потере массы [7].

Целью настоящего исследования была оценка конвертируемости вегетативной части топинамбура различными штаммами микро- и макроскопических грибов в условиях твердофазной ферментации.

Эксперимент. Объектом исследования служили штаммы несовершенных, аскомицетовых и базидиальных грибов из коллекции культур кафедры химической технологии древесины и биотехнологии СибГТУ: Т1 и М99/9 *Trichoderma*; 26 штаммов рода *Fusarium*; Po-1 *Pleurotus ostreatus*, Tv-06 *Trametes versicolor*, Le-06 *Lentinus edodes*, Pb-06 *Piptoporus betulinus*, Fp-06 *Fomitopsis pinicola*. Штаммы были выделены из различных экологических ниш (ризосфера, филлосфера и корневая система сеянцев хвойных; зерно пшеницы и ячменя; почва; плодовые тела грибов) из различных географических регионов Красноярского края и Республики Тыва в период 2004–2011 гг. и вегетативная часть то-

пинамбура местного сорта, отобранная в сентябре 2012 г. в Сухобузимском районе Красноярска. Исследуемое сырье высушивали на воздухе до воздушно сухого состояния и размалывали на установке дезинтеграторного типа.

Выявление общей фенолоксидазной активности осуществляли по методу Бавендамма [9–10], для чего исследуемые штаммы культивировали на сушловом агаре с добавлением 0,5 % танина при температуре 25–27 °С в течение 7 суток. Штаммы с наиболее выраженной активностью (образование интенсивного коричневого пигмента за краем колонии) отбирали для последующего твердофазного культивирования.

В качестве растительного субстрата использовали стерильную вегетативную часть топинамбура с влажностью 70–72 %; культивирование осуществляли при температуре 26–28 °С в течение 7 суток, измеряя ростовые характеристики (диаметр колоний, мм; плотность, баллы; высота, мм) [1; 2]. Субстраты до и после биодеструкции подвергали химическому анализу с использованием традиционных методов, принятых в химии растительного сырья [11]. Переваримость субстратов определяли хлорфенольным методом [12]. Содержание сырого протеина в исследуемых субстратах определяли по методу Кьельдаля [13], белка — с помощью амидо-черного [5]. Гидролиз препаратов белка проводили 6N HCL. Аминокислотный состав белков анализировали методом ионообменной хроматографии с использованием автоматического анализатора аминокислот ААА-339 М (Mikrotechna, Чехия). Состав и содержание липидов определяли по методу Блайя – Дайэра [7].

Обсуждение результатов. В ходе работы исследовано: два штамма грибов рода *Trichoderma* Т1 и М99/9; 26 штаммов рода *Fusarium*; пять штаммов базидиомицетов — Po-1 *Pleurotus ostreatus*, Tv-06 *Trametes versicolor*, Le-06 *Lentinus edodes*, Pb-06 *Piptoporus betulinus*, Fp-06 *Fomitopsis pinicola*, которые обладали различной фенолоксидазной активностью.

Фенолоксидазной активностью обладают восемь штаммов, из них четыре штамма грибов *Fusarium*, таких как Ш1п, G11, Kx1п, Kx4п, два штамма грибов *Trichoderma* М99/9 и Т1, а также *Pleurotus ostreatus* Po-1, *Trametes versicolor* Tv-06.

У всех отобранных штаммов грибов проведена оценка фенолоксидазной активности по группам Бавендама. Пять штаммов, обладающих фенолоксидазной активностью, относятся к 1-й группе Бавендама (*Fusarium* Kx1п, Kx4п, *Trichoderma* Т1, М99/9 и *Trametes versicolor* Tv-06) и три штамма — к 2-й группе (*Fusarium* Ш1п, G11 и *Pleurotus ostreatus* Po-1). Все исследуемые штаммы оказались способны колонизировать растительный субстрат, однако их радиальная скорость роста и ростовой коэффициент существенно отличались друг от друга (табл. 1).

Результаты показали, что грибы *Trichoderma asperellum* М 99/9, *Trichoderma sp.* Т1, *Trametes versicolor* Tv-06, *Fusarius sporotrihioides* Kx1п имеют достаточно высокую скорость роста; у остальных грибов она более чем в 2 раза ниже, а для гриба *Fusarium tricinctum* G11 — незначительна и составляет 0,3 мм/сут.

Таблица 1

Ростовые характеристики грибов при твердофазной ферментации вегетативной части топинамбура

Вид, штамм	Ростовой коэффициент	Радиальная скорость роста, мм/сут
<i>Trichoderma asperellum</i> М 99/9	102,8	11,3
<i>Trichoderma sp.</i> Т1	51,4	11,3
<i>Trametes versicolor</i> Тv-06	51,3	11,3
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Кх1п	44,3	11,3
<i>Fusarium eguisei</i> Кх4п	17,8	5,2
<i>Pleurotus ostreatus</i> Ро-1	17,0	4,5
<i>Fusarium ricinctum</i> Ш1п	15,8	5,1
<i>Fusarium tricinctum</i> Г11	5,0	0,3

Оценка ростовых характеристик позволила выделить наиболее перспективные для биоконверсии вегетативной части топинамбура штаммы, такие как М 99/9 *Trichoderma asperellum*, Т1 *Trichoderma sp.*, Тv-06 *Trametes versicolor* и Кх1п *Fusarium sporotrichioides*, имеющие одинаковую радиальную скорость роста (11,3 мм/сут). Однако ростовой коэффициент у этих четырех штаммов грибов неодинаков, у штамма М99/9 *Trichoderma asperellum* в 2 раза выше, чем у Т1 *Trichoderma sp.*, Тv-06 *Trametes versicolor*.

Все отобранные активные штаммы из родов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Trametes* и *Pleurotus* использовали для твердофазной ферментации вегетативной части топинамбура.

Химический состав вегетативной части топинамбура до и после биодеструкции макро- и микромицетами приведен в табл. 2.

Судя по результатам, по характеру воздействия на биомассу топинамбура исследуемые штаммы условно можно разделить на две группы. Штаммы 1-й группы — *Trametes versicolor* Тv-06, *Pleurotus ostreatus* Ро-1, *Trichoderma* Т1 и М 99/9 — обладают сравнительно большей лигнолитической и целлюлазной активностью.

Таблица 2

Химический состав вегетативной части топинамбура до и после биоконверсии

Наименование штамма гриба	Содержание, % а.с.с.					Убыль массы
	Водо-экстрактивные вещества	Легко-гидролизующие полисахариды	Трудно-гидролизующие полисахариды	Итого полисахаридов	Лигнин	
Исходный топинамбур	25,67	13,90	38,28	52,18	17,92	
<i>Trametes versicolor</i> Тv-06	<u>53,33</u> 38,34	<u>7,02</u> 5,03	<u>27,23</u> 19,58	<u>34,25</u> 24,61	<u>13,06</u> 9,39	28,1
<i>Pleurotus ostreatus</i> Ро-1	<u>46,50</u> 39,66	<u>7,30</u> 6,23	<u>33,90</u> 28,92	<u>41,20</u> 35,15	<u>11,20</u> 9,55	14,70
<i>Trichoderma</i> М 99/9	<u>56,55</u> 47,79	<u>8,42</u> 7,19	<u>22,11</u> 18,90	<u>30,53</u> 25,09	<u>13,9</u> 11,73	14,52
<i>Trichoderma</i> Т 1	<u>54,52</u> 45,58	<u>8,68</u> 7,33	<u>23,26</u> 19,63	<u>31,94</u> 26,96	<u>15,40</u> 12,99	15,63
<i>Fusarium</i> Кх1п	<u>16,77</u> 13,42	<u>18,41</u> 14,72	<u>42,11</u> 33,62	<u>60,51</u> 48,41	<u>9,78</u> 15,83	20,05
<i>Fusarium</i> Кх4п	<u>25,50</u> 20,14	<u>18,63</u> 14,72	<u>36,83</u> 29,12	<u>55,46</u> 43,84	<u>18,96</u> 15,17	20,99
<i>Fusarium</i> Ш1п	<u>23,82</u> 19,68	<u>15,48</u> 12,77	<u>36,75</u> 30,32	<u>52,23</u> 43,09	<u>19,00</u> 15,67	17,48
<i>Fusarium</i> Г11	<u>18,02</u> 15,84	<u>16,13</u> 14,18	<u>32,07</u> 28,19	<u>48,20</u> 42,37	<u>17,01</u> 14,97	12,09

Примечание. Числитель — химический состав в расчете на субстрат; знаменатель — химический состав с учетом убыли массы.

Количество лигнина и полисахаридов в процессе культивирования этих штаммов снижается в 1,5–1,9 раза, и примерно на такую же величину возрастает содержание водорастворимых веществ в субстрате. Вторая группа — микроскопические грибы рода *Fusarium*. Они обладают меньшей лигнолитической и целлюлазной активностью, о чем свидетельствует изменение

содержания лигнина в субстрате на 11,7–16,5 % и полисахаридов на 7,3–18,9 %. В этой группе более существенные изменения наблюдаются в содержании водорастворимых веществ сахарной природы, количество которых в процессе культивирования снижается в 1,5–1,8 раза, т. е. убыль массы в этом случае связана с конверсией водорастворимых веществ. Следует отметить,

что одними из ключевых показателей для создания биопрепарата для кормовых целей являются содержание белковых веществ и их аминокислотный состав. С учетом ростовых характеристик и влияния воздействия исследуемых грибов на субстрат наиболее перспективным в практическом отношении является штамм *Trichoderma asperellum* М 99/9, с которым и проводили дальнейшие биохимические исследования.

Результаты проведенной работы показали, что в процессе биоконверсии в топинамбуре увеличивается содержание водорастворимых углеводов с 8,2 в исходном субстрате до 19,1 % в биодеструктурированном и белка с 5,7 до 7,8 % соответственно.

В табл. 3 приведен аминокислотный состав топинамбура до и после культивирования на нем штамма М99/9 *Trichoderma asperellum*.

Таблица 3

Аминокислотный состав белка топинамбура до и после биодеструкции (г на 100 г белка а.с.с.)

Наименование аминокислоты	Топинамбур	Эталонный белок ФАО)
Аланин	15,1/11,8	–
Аргинин	0,75/2,1	–
Аспарагиновая кислота	15,1/11,3	–
Валин	1,8/3,8	5,0
Гистидин	3,3/3,4	–
Глицин	6,6/11,3	–
Глутаминовая кислота	13,6/14,7	–
Изолейцин	2,9/6,7	4,0
Лейцин	18,7/0,4	7,0
Лизин	1,8/3,4	5,5
Метионин	–/1,7	–
Пролин	1,5/1,3	–
Серин	6,6/8,0	–
Тирозин	5,1/4,6	4,0
Треонин	4,8/10,9	1,0
Триптофан	–/–	–
Фенилаланин	2,2/4,6	–
Цистин	–	–
Сумма незаменимых аминокислот	32,2/31,5	26,5

В исходном топинамбуре обнаружено 15 аминокислот, из которых 6 незаменимых, а в биодеструктурированном топинамбуре — 16 аминокислот и 7 незаменимых (табл. 3). В ходе биоконверсии растительного субстрата происходило его обогащение валином, изолейцином, треонином, метионином и фенилаланином, содержание которых в ряде случаев превосходило эта-

лонный белок.

Существенные изменения наблюдаются и по содержанию и составу липидов. Как видно из результатов (табл. 4), в процессе культивирования исследуемого штамма увеличивается общее содержание липидов в 1,6 раза и содержание нейтральных липидов в 1,75 раза, снижается содержание гликолипидов — в 2,0 раза, и остается без изменений содержание фосфолипидов.

Таблица 4

*Состав липидов топинамбура до и после деструкции штаммом М99/9 *Trichoderma asperellum* (%)*

Показатель	Исходный топинамбур	Биодеструктурированный топинамбур
Липиды, в т. ч.	4,5	7,3
– нейтральные	4,0	7,0
– гликолипиды	0,4	0,2
– фосфолипиды	0,1	0,1
Убыль массы	–	14,5

Таким образом, в ходе ферментации вегетативной части топинамбура штаммом М 99/9 *Trichoderma asperellum* происходит изменение биохимического состава субстрата. Отмечено снижение содержания полисахаридов в среднем в два раза и лигнина — в 1,5 раза; увеличение содержания водорастворимых веществ в 2,2 раза, липидов — в 1,6 и веществ белковой природы — в 1,3 раза.

Благоприятный биохимический состав, хорошая переваримость (48 %) и отсутствие патогенности у используемого штамма М 99/9 *Trichoderma asperellum* дают основание рекомендовать биодеструктурированную вегетативную часть топинамбура для использования в кормовых целях.

Выводы

В ходе работы исследовано 33 штамма грибов, из которых 27 % синтезировали внеклеточные полифенолоксидазы. Наиболее активные штаммы из родов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Trametes* и *Pleurotus* использовали для твердофазной ферментации вегетативной части топинамбура, в ходе которой был отобран наиболее перспективный для биоконверсии штамм М 99/9 *Trichoderma*. По совокупности ростовых параметров и показателей биохимических превращений субстрата его можно рекомендовать для биоконверсии вегетативной части топинамбура с целью получения кормового препарата.

Литература

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1984. 239 с.
2. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.

3. Садыкова В.С. Биология и структура популяций грибов рода *Trichoderma* (Pers: Fr.) и их практическое использование: автореф. дис.... д-ра биол. наук. М., 2012. 45 с.
4. Махова Е.Г. Культивирование грибов рода *Trichoderma* на лигно-углеводных субстратах: дис. ... канд. техн. наук. Красноярск, 2003. 135 с.
5. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн.1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
6. Медведева С.А. Превращение ароматической компоненты древесины в процессе биоделигнификации: автореф. дис.... д-ра хим. наук. Иркутск, 1995. 40 с
7. Рызанова Т.В., Чупрова Н.А., Лунева Т.А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры хвойных пород /Катализ в промышленности. 2014. № 6. С. 64-70.
8. Ахметова З.Р. Лигнолитические, ксиланолитические и целлюлолитические ферменты некоторых базидиальных грибов и их взаимосвязь в разложении лигноцеллюлозы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ташкент, 1999. 42 с.
9. Бабицкая В.Г. Прикладная биохимия и микробиология // Ферментативная деградация лигнина, содержащегося в растительных субстратах, мицелиальными грибами. 1994. Т. 30, Вып. 6. С. 827-835.
10. Bavendamm W.Z. Uber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen // Z. Pflanzenkrankheiten. 1928. Vol. 38. P. 257-276.
11. Рызанова Т.В., Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Красноярск: СибГТУ, 2012. 358 с.
12. Журавлев Е.М. Руководство по зоотехническому анализу кормов. М.: Сельхозиздат, 1963. 295 с.
13. Плешков Б.Л. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1986. 503 с.
14. Бузун Г.Н., Джемухадзе К.М., Мелишко Ф.Л. Определение белков в растениях с помощью амидо-черного // Физиология растений. 1982. Т. 29, Вып. 1. С. 198-204.
15. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
2. Bukhalo A.S. Higher edible basidiomycetes in pure culture. Kiev: Naukova dumka, 1988. 144 p.
3. Sadykova V.S. Biology and population structure of fungi of the genus *Trichoderma* (Pers: Fr.) and their practical use: avtoref. dis.... d-ra. biol. nauk. M., 2012. 45 p.
4. Makhova E. G. Cultivation of *Trichoderma* fungi to the ligno-carbohydrate substrates: dis. ... kand. tekhn. nauk. Krasnoyarsk, 2003. 135 p.
5. Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashchenko V.I. Theoretical bases of biotechnology of wood composites. Book 1. Wood and destroy it fungi. M.: Nauka, 2001. 264 p.
6. Medvedeva S.A. Transformation of aromatic components of wood in the process of biological delignification: avtoref. dis.... d-ra khim. nauk. Irkutsk, 1995. 40 p.
7. Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Luneva T.A. Effect of *Trichoderma* fungi on softwood bark lignin // Catalysis in Industry. 2014. № 6. P. 64-70.
8. Akhmetova Z.R. Lignolytic, xylanolytic and cellulolytic enzymes some basidiomycetes and their relationship in the decomposition of lignocellulose: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Tashkent, 1999. 42 p.
9. Babitskaya V.G. Applied Biochemistry and Microbiology // Fermentativnaya degradatsiya lignina, soderzhashchegosya v rastitel'nykh substratakh, mitselial'nymi gribami. 1994. T. 30, Vyp. 6. P. 827-835.
10. Bavendamm W.Z. Uber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen // Z. Pflanzenkrankheiten. 1928. Vol. 38. P. 257-276.
11. Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. Wood chemistry. Krasnoyarsk: SibGTU, 2012. 358 p.
12. Zhuravlev E.M. Guide to the zootechnical analysis of forages. M.: Sel'khozizdat, 1963. 295 p.
13. Pleshkov B.L. Plant Biochemistry Practicum. M.: Kolos, 1986. 503 p.
14. Buzun G.N., Dzhemukhadze K.M., Melishko F.L. Determination of the proteins in the plants through amido black // Russian Journal of Plant Physiology. 1982. T. 29, Vyp. 1. P. 198-204.
15. Keits M. Technique lipidology. M.: Mir, 1975. 322 p.

References

1. Bilai V.I. Methods of experimental mycology. Kiev: Naukova dumka, 1984. 239 p.