

1

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет Технології виробництва і переробки продукції тваринництва
Кафедра Харчових технологій

Пояснювальна записка
до кваліфікаційної роботи на здобуття ступеня вищої освіти

бакалавр

бакалавр, магістр

на тему: «Вдосконалення технології екстрагування полісахаридів з грибів
Grifola frondosa субкритичною водою»

Виконав: здобувач вищої освіти
за освітньо-професійною
програми Харчові технології

назва освітньо-професійної програми

спеціальності 181 Харчові технології

код та найменування спеціальності

ступеня вищої освіти бакалавр

бакалавр, магістр

групи 181 ХТ

Красько Д.К.

Прізвище та ініціали здобувача вищої освіти

Керівник: Сукманов В.О.

Прізвище та ініціали керівника

Рецензент: Шостя А.М.

Прізвище та ініціали рецензента

Полтава – 2022 року

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет Технології виробництва і переробки продукції тваринництва
Кафедра Харчових технологій

Освітньо-професійна програма Харчові технології
назва освітньо-професійної програми

Спеціальність 181 Харчові технології
код за найменування спеціальності

Ступінь вищої освіти бакалавр
бакалавр, магістр

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувачка кафедри Харчових технологій

к.т.н., доцент Будник Н.В.

(наукове звання, посада, прізвище та ініціали зав. кафедрою)



«16» вересня» 2024 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Красько Дмитро Костянтинович

Прізвище, ім'я та по-батькові здобувача вищої освіти

1. Тема роботи: «Вдосконалення технології екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою».

керівник роботи докт. техн. наук, професор кафедри харчових технологій
(наукове звання, посада, прізвище та ініціали керівника роботи)

Сукманов В.О.

затверджені наказом ПДАУ від « 01 » « квітня » 2022 року № «187-ст».

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи « 16 » « травня » 2022 р.

3. Вихідні дані до роботи:

1. Об'єкт дослідження: технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa*.

2. Базові показники при проведенні досліджень: використати методи екстрагування субкритичною водою та метод мацерації; визначити вміст загального полісахариду та загального білка, в'язкість, антиоксидантну активність зразків екстрактів.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Розділ 1. Огляд літератури за проблемою досліджень

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень

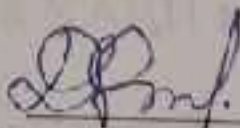
Розділ 3. Результати власних досліджень

5. Перелік графічного матеріалу: схеми, рисунки, графіки, діаграми за темою та об'єктом дослідження

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Спрок виконання етапів роботи	Примітка
1	Вибір і затвердження теми роботи.	15-21 вересня 2021	вик
2	Складання і затвердження розгорнутого плану та завдання на кваліфікаційну роботу	22-24 вересня 2021	вик
3	Опрацювання літературних джерел	25 вересня – 25 жовтня 2021	вик
4	Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи	26 жовтня – 26 листопада 2021	вик
5	Виконання теоретичного розділу роботи	27 листопада – 27 грудня 2021	вик
6	Виконання аналітичних розділів роботи	28 грудня 2021 – 2 лютого 2022	вик
7	Виконання спеціальних розділів	3 лютого – 3 березня 2022	вик
8	Оформлення тексту роботи	3 березня – 15 травня 2022	вик
9	Попередній захист роботи на кафедрі	16 травня – 22 травня 2022	вик
10	Нормоконтроль	23 травня - 26 травня 2022	вик
11	Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій	27 травня – 7 червня 2022	вик
12	Захист кваліфікаційної роботи	8-15 червня 2022	

Здобувач вищої освіти

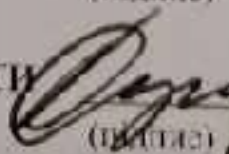


Красько Д. К.

(підпис)

(прізвище та ініціали здобувача вищої освіти)

Керівник роботи



Сукманов В.О.

(підпис)

(прізвище та ініціали здобувача вищої освіти)

АНОТАЦІЯ

Пояснювальна записка до кваліфікаційної роботи: 43 с., 9 рис., 8 табл., 49 джерел.

Мета дослідження - вдосконалити технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa* шляхом використання субкритичної води та отримання раціональних параметрів процесу.

Об'єкт досліджень – технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa*.

Предмет досліджень – технологічні параметри процесу екстрагування полісахаридів субкритичною водою, вміст білку, в'язкість, антиоксидантна активність полісахаридів.

Методи дослідження – теоретичні: аналіз, синтез, порівняння, узагальнення; експериментальні: екстрагування біологічно активних речовин субкритичною водою, визначення вмісту загального полісахариду та загального білка, в'язкості, антиоксидантної активності зразків.

Пояснювальна записка містить огляд літератури з проблеми дослідження; опис експериментального обладнання та методик проведення досліджень. Опис результатів власних експериментальних досліджень містить обґрунтування значень параметрів екстрагування мацерацією та субкритичною водою; дослідження впливу температури екстракції на вихід полісахаридів; дослідження впливу часу екстракції на вихід полісахаридів; дослідження впливу співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів; порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації; висновки та рекомендації щодо подальшого використання результатів досліджень.

ГРИБ *GRIFOLA FRONDOSA*, ЕКСТРАКТ, ПОЛІСАХАРИДИ, СУБКРИТИЧНА ВОДА, АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ.

ABSTRACT

Explanatory note to the qualification work: 43 pages, 9 figures, 8 tables, 49 sources.

The purpose of the study is to improve the technology of extraction of polysaccharides from *Grifola frondosa* by using subcritical water and obtaining rational process parameters.

The object of research is the technology of extraction of polysaccharides from *Grifola frondosa*.

Subject of research - technological parameters of the process of extraction of polysaccharides with subcritical water, protein content, viscosity, antioxidant activity of polysaccharides.

Research methods - theoretical: analysis, synthesis, comparison, generalization; experimental: extraction of biologically active substances with subcritical water, determination of the content of total polysaccharide and total protein, viscosity, antioxidant activity of samples.

The explanatory note contains a review of the literature on the problem of research; description of experimental equipment and research methods. The description of the results of our own experimental research contains a substantiation of the values of extraction parameters by maceration and subcritical water; study of the effect of extraction temperature on the yield of polysaccharides; study of the effect of extraction time on the yield of polysaccharides; study of the effect of the ratio of water and sample on the yield of polysaccharides; comparison of subcritical water extraction efficiency and maceration method; conclusions and recommendations for further use of research results.

GRIFOLA FRONDOSA MUSHROOMS, EXTRACT, POLYSACCHARIDES, SUBCRITICAL WATER, ANTIOXIDANT ACTIVITY.

ЗМІСТ

	стор.
ВСТУП	8
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Використання біологічно активних речовин в харчових технологіях	11
1.2. Обґрунтування використання обраної рослинної сировини у якості джерела біологічно активних речовин	11
1.3. Сучасні методи екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини	13
Мета та завдання дослідження	18
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	19
2.1. Матеріали та реагенти	19
2.2. Апарат екстрагування субкритичною водою	19
2.3. Методика екстрагування субкритичною водою	20
2.4. Апарат екстрагування мацерацією	21
2.5. Методика екстрагування мацерацією	21
2.6. Методика визначення загального полісахариду та загального білка	22
2.7. Аналіз антиоксидантної активності полісахаридів <i>in vitro</i>	22
2.7.1. Зниження потужності	22
2.7.2. Аналіз уловлювання радикалів DPPH	23
2.8. Статистичний аналіз результатів експериментів	23
3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
3.1. Обґрунтування значень параметрів екстрагування мацерацією та субкритичною водою	24
3.2. Дослідження впливу температури екстракції на вихід полісахаридів	25

3.3. Дослідження впливу часу екстракції на вихід полісахаридів	26
3.4. Дослідження впливу співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів	27
3.5. Порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації	29
3.6. Дослідження антиоксидантної активності екстрактів	30
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39

ВСТУП

Пошук природних біологічно активних сполук з потужним потенціалом для використання у харчових технологіях, профілактики захворювань людини та задоволення потреб споживачів різних вікових категорій та з різним способом життя є ключовою темою в багатьох лабораторіях і галузях промисловості [1-3]. Ці сполуки, отримані з сировини природнього походження ефективно взаємодіють з білками, ДНК та іншими біологічними молекулами для отримання бажаного результату, який можна було б використати для створення природних засобів з терапевтичним ефектом [3].

Нині в харчовій промисловості спостерігається помітна тенденція до розробка та виготовлення функціональних виробів [4]. Цей новий клас харчових продуктів користується великим успіхом на світових ринках завдяки зростання інтересу споживачів до «здорової» їжі. Отже, фармацевтичний та харчовий домени мають схожий інтерес для отримання та характеристики нових біологічно активних сполук, які можна використовувати як ліки, функціональні харчові інгредієнти або нутрицевтики. Однак обмеження постачання біологічно активних інгредієнтів з природних джерел негативно впливають на широкомасштабне їх використання в харчових технологіях.

Біологічно активні сполуки часто синтезуються в невеликих кількостях в природі і присутні у вигляді кон'югатів або сумішей в екстрактах, які потребують трудомісткі та трудомісткі процедури очищення. Крім того, структурна різноманітність і складність цих молекул роблять їх хімічний синтез не вигідним.

У зв'язку з цим, притаманні труднощі скринінгу та виробництва цих молекул призвели до розвитку нових альтернативних технологій для подолання цих обмежень.

Останні технологічні досягнення та розробка нових методи покращення виробництва, виявлення, поділу та дослідження властивостей біологічно активних речовин зробили революцію в харчових технологіях і надала

можливість отримувати натуральні екстракти, які могли б бути потенційно ефективними у технологіях харчових продуктів [5]. Прикладами цих технологій є переважно метаболічні інженерія та методи оптимізації виділення цих молекулярних видів. Наприклад, молекулярно-біологічні методи використовуються для виділення бактерій для виробництва таких речовин, як ізопреноїд сполуки, спочатку виділений з рослин, а потім використаний для виробництва нових флаванонів і дигідрофлавонолів. Крім того, процеси вилучення та розділення сполук були розроблені для отримання високоочищених продуктів, що робить їх корисними в широкому діапазоні застосувань. Ці технології можуть забезпечити інноваційний підхід до збільшення виробництва бажаних сполук, приділяючи особливу увагу антиоксидантам з можливим їх застосуванням у розробці нутрицевтиків та функціональних харчових продуктів [6].

Мета дослідження - вдосконалити технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa* шляхом використання субкритичної води та отримання раціональних параметрів процесу.

Об'єкт досліджень – технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa*.

Предмет досліджень – технологічні параметри процесу екстрагування полісахаридів субкритичною водою, вміст білку, в'язкість, антиоксидантна активність полісахаридів.

Для досягнення мети дослідження ми сформулювали завдання, які потрібно вирішити:

- дослідити вплив температури екстракції на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;
- дослідити вплив часу екстракції на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;
- дослідити вплив співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;

- провести порівняння ефективності екстрагування полісахаридів субкритичною водою та традиційним екстрагуванням мацерацією гарячою водою;
- проаналізувати антиоксидантну активність полісахаридів, отриманих субкритичною водою та мацерацією з антиоксидантною активністю аскорбінової кислоти як контрольного зразка;
- запропонувати та обґрунтувати раціональні параметри екстрагування грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою.

Дана робота виконувалась в НДЛ «Субкритичні технології в харчових виробництвах» ПДАУ в рамках бюджетної теми кафедри харчових технологій ДР №0115U006745 «Інноваційні та ресурсозберігаючі технології харчових виробництв» (Розділ «Технології та обладнання субкритичної екстракції біологічно активних речовин з рослинної сировини»).

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Використання біологічно активних речовин в харчових технологіях

Одним із перспективних напрямів розвитку інноваційних технологій харчових продуктів є створення функціональних продуктів харчування - продуктів або інгредієнтів, які при регулярному вживанні викликають певний корисний вплив на здоров'я [7]. Ключовою складовою та важливим чинником у розробці функціональних продуктів харчування є використання біологічно активних сполук природнього, переважно рослинного, походження. Тому, зазвичай, ці продукти містять різні кількості та типи біоактивних сполук [7, 8]. Та коли біоактивна сполука входить до складу харчових продуктів з певним призначенням, новий продукт можна вважати функціональним харчування [7]. У якості джерела біологічно активних сполук використовують вторинну сировину агропромислового комплексу (лушпіння цибулі, виноградні, яблучні вичавки, соєвий шрот, очистки картоплі, моркви та ін.), рослинну сировину (квітки, стебла, корінці та інші складові рослин). Дана сировина у своєму складі має велику кількість цінних сполук. При розробці технології функціональних продуктів харчування перш за все необхідно враховувати, для якої групи споживачів буде розроблятися конкретний продукт, особливості та обґрунтовану добову норму його споживання, технологічні та поживні властивості продукту та інше. Слід звернути увагу на зростаючу зацікавленість та збільшення досліджень, спрямованих на розвиток перспектив використання гриба *Grifola frondosa* в технологіях нових видів функціональних харчових продуктів [9-11].

1.2. Обґрунтування використання обраної рослинної сировини у якості джерела біологічно активних речовин

Гриб *Grifola frondosa* (Грифола кучерявенька, грифола листувата, гриб-баран) в Україні розповсюджений на території Закарпаття, Карпатських та

західноукраїнських лісів, у Лісостепу, Степу. Колір від сіро-зеленуватого до сіро-рожевуватого, залежно від віку та освітлення. М'якоть біла, ламка, має цікавий горіховий запах та смак. Гриб має своєрідний горіховий смак. У їжу краще використовувати молоді екземпляри, які варять, сушать. Дуже гарний для супів, бульйонів та смаження. [12] (Рис. 1.1).



Рис. 1.1. Гриб *Grifola frondosa* (Грифола кучерявенька, грифола листувата, гриб-баран)

Grifola frondosa є їстівним грибом, який належить до сімейства polyporaceae, є гриб-базидіоміцетом. Полісахариди *G. frondosa* останнім часом привернули велику увагу через їх різні фізіологічні активності, включаючи антиоксидантну, [13, 14] протипухлинну, [15] антиатеросклеротичну, [16] протидіє стомленню, [17-19]. Різні методи встановлюються для екстракції полісахаридів з різних рослин, у тому числі традиційної екстракції гарячої води (HWE), [20-22] НВЧ-допомоги екстракції, [23] ультразвукова екстракція, [24, 25] ферментативна екстракція. [5, 26] Останніми роками було опубліковано багато статей про застосування субкритичної води для

екстракції біологічно активних сполук із рослин. Приклади таких досліджень включають ефірні масла *Bunium persicum* Boiss [27], екстракцію фенольних сполук з картопляної шкірки [28] і екстракцію флавонол кверцетину з цибулинної шкірки [29]. Екстрагування субкритичною водою є швидкий та ефективний інструмент для вилучення полісахаридів, однак кількість досліджень, які були проведені недостатньо для обґрунтованого застосування саме цього методу при екстрагуванні полісахаридів з гриба *Grifola frondosa*.

Враховуючи велику цінність даного продукту, його антиоксидантні властивості та використання у харчових технологіях, доцільно висунути гіпотезу про високу ефективність використання у харчових технологіях і екстрактів з даного продукту.

1.3. Сучасні методи екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини

Природні біологічно активні сполуки включають широку різноманітність структур і функціональних можливостей, які забезпечують чудову пул молекул для виробництва нутрицевтиків, функціональних продуктів харчування та харчових добавок. Деякі з цих сполук можна знайти в природі у високій концентрації, наприклад поліфеноли, але інші можна знайти лише в дуже низьких рівнях, так що для отримання достатньої кількості необхідний масовий збір, а їх структурна різноманітність і складність роблять хімічний синтез нерентабельний. Притаманні труднощі скринінгу та виробництва цих сполук призвели до розвитку передових технологій. Зазвичай використовуються звичайні рідкі методи їх добування [30].

На сьогодні існують більше десяти різних способів екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини, це рідинна або твердо-рідинна екстракція, а також вдосконалена екстракція рідиною під тиском, субкритична та надкритична екстракції, мікрохвильові та ультразвукові екстракції. Крім того, ці методи вилучення можуть бути покращено за допомогою попередніх етапів (сизимні та миттєві контрольовані екстракції за

допомогою перепаду тиску), які допомагають вивільнити сполуки з матриці. Ці технології можуть забезпечити в найближчі кілька років інноваційний підхід до збільшення виробництва специфічних сполук для використання в якості нутрицевтиків або як інгредієнтів у розробці функціональних харчових продуктів [30].

Кожен з існуючих методів екстрагування має як позитивні сторони, так і певні недоліки. Ґрунтовний аналіз цих сторін дозволяє обрати найбільш ефективний метод екстрагування виходячи з конкретних вимог до технології екстрагування, що розробляється, властивостей сировини та цільового продукту, на якому зосереджено увага дослідників, наявне технологічне обладнання та техніко-експлуатаційні та економічні вимоги до технології [31].

Аналіз досліджень, проведених лабораторіями світу показав [32], що екстракційні процеси для речовин в системах «рідина-тверде тіло», які складають основу ряду найважливіших виробництв харчової промисловості, вимагають інноваційних підходів, і, в першу чергу, пропонувані методи повинні бути екологічно чистими, високоефективними по відношенню до вилученими цільовим продуктів, що забезпечує надійну селективність вилучення, високопродуктивними і енергозберігаючими.

Аналіз наявної сучасної інформації призвів до висновку про перспективність використання методу екстрагування субкритичною водою [32,33].

Дана технологія екстрагування на сьогодні є найбільш інноваційною та використовується для вилучення практично всіх існуючих біологічно активних сполук з будь якої вторинної сировини АПК (виноградні, яблучні вичавки, очистки з картоплі, буряка, моркви, лушпиння цибулі та ін.) чи будь якої складової частини рослинної сировини (листя, корінці, квітки та ін.) [33].

Найбільш повний аналіз використання технології екстрагування субкритичною водою наведено у роботах [32-35].

Метод субкритичної водної екстракції - один із підходів, що використовуються для виділення цінних компонентів із рослин та вторинної

сировини агропромислового комплексу. При застосуванні даного методу критичні температура та тиск води становлять 374 °C та 22,1 МПа, відповідно. [35] Технологія субкритичного екстрагування використовує воду при температурі від 100 °C до 374 °C з деяким тиском (вище 5 МПа та нижче 22 МПа), щоб підтримувати воду у рідкому стані [35].

Зведена інформація про хімічні та фізичні властивості рідкої води у субкритичному стані наведено у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Хімічні та фізичні властивості рідкої води при різних температурах і тисках насичення [35]

Властивість	T = 298 K (25 °C, 0,1 МПа)	T = 373 K (100 °C, 0,1 МПа)	T = 473 K (200 °C, 1,5 МПа)	T = 623 K (350 °C, 17 МПа)
Константа дисоціації, K_d	$1,0 \times 10^{-14}$	$5,6 \times 10^{-13}$	$4,9 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-12}$
pK_d	13,99	12,25	11,31	11,92
Відносна статична діелектрична проникність, ϵ_r	78,5	55,4	34,8	14,1
Дипольний момент	1,85	1,85	1,85	1,85
Питома теплоємність, C_p , (г ⁻¹ К ⁻¹)	4,18	4,22	4,51	10,1
Теплота пароутворення, H_v (кДж/моль)	44,0	40,7	35,0	15,6
Густина (г/см ³)	0,997	0,958	0,865	0,579
Динамічна в'язкість, η (мПа с)	0,891	0,282	0,134	0,067
Поверхневий натяг (дин/см)	72,0	58,9	37,6	3,7
Коефіцієнт самодифузії, D (м ² /с)	$2,3 \times 10^{-9}$	$8,6 \times 10^{-9}$	$23,8 \times 10^{-9}$	N / A

Найбільш важливим фізико-хімічним параметром, який визначає можливості води як розчинника для екстракції БАР є відносна діелектрична проникність. Залежність діелектричної проникності від температури - це

унікальна властивість води. Вода при кімнатній температурі - дуже полярний розчинник з діелектричною проникністю ϵ близько 80 при атмосферному тиску. (Полярний розчинник - сполуки, молекули яких мають електричний дипольний момент). Для полярних речовин, в порівнянні з неполярними, характерні висока діелектрична проникність, підвищені температура кипіння і температура плавлення. Дипольний момент зазвичай виникає внаслідок різної електронегативності складових молекулу атомів, через що зв'язки в молекулі набувають полярності. Однак, для утворення дипольного моменту потрібно не тільки полярність зв'язків, а й відповідне їх розташування в просторі). Значення діелектричної проникності ϵ може бути зменшено, наприклад до 27, коли вода нагрівається до 250 °C за умови підтримування її в рідкому стані відповідним тиском.

Узагальнення вищенаведеної інформації дозволяє констатувати, що рідка вода при підвищеній температурі і тиску є розчинником з низькими значеннями ϵ , η і густини, що забезпечує більш високу швидкість масопередачі і поліпшене змочування зразка за рахунок більш високого коефіцієнта дифузії і більш низької в'язкості і поверхневого натягу.

Такі істотні зміни, що відбуваються з фізико-хімічними властивостями води при збільшенні тиску і температури дозволяють нам сформулювати основні переваги СКВ як розчинника:

- поєднання властивостей газів при високому тиску (низька в'язкість, високий коефіцієнт дифузії) і рідин (висока розчинююча здатність);
- поєднання нехтує малого міжфазного натягу з низькою в'язкістю і високим коефіцієнтом дифузії, що дозволяє СКВ проникати в пористі структури легше в порівнянні з рідинами;
- висока чутливість розчинюючої здатності СКВ до зміни тиску або температури;
- простота поділу СКВ і розчинених в ній речовин при скиданні тиску;
- технологічна і екологічна безпека виробництва;
- низька собівартість.

Використання СКВ замість органічних розчинників підвищує екологічну безпеку виробництв, а також ступінь чистоти одержуваних продуктів, враховуючи відсутність в них слідів токсичних органічних розчинників і домішок, що містяться в них; проявляє хімічну інертність до вилучених речовин.

І ось всі ці надзвичайні властивості і можливості використання СКВ як розчинника пов'язані з її мікроструктурою і особливостями процесів, що відбуваються на молекулярному рівні і багато в чому обумовлені особливим характером і динамікою водневих зв'язків.

При підвищенні температури до 250 °C діелектрична проникність води також зменшується з 80 до 27, що дуже схоже на діелектричну проникність етанолу при температурі навколишнього середовища [35], гідроліз та розкладання, без будь-якого додаткового каталізатора [3]. В умовах СВЕ клітинна структура тканин рослин може бути порушена і, отже, призвести до вивільнення кілька хімічних сполук у позаклітинному середовищі, які розчиняються у гарячій воді. [35] Технологія екстрагування субкритичною водою вважається економічною у часі, дає високий вихід цільових сполук і не містить токсичних залишків розчинників для виробництва полісахаридів рослин у порівнянні з традиційними методами.

Таким чином, мета дослідження - вдосконалити технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa* шляхом використання субкритичної води та отримання раціональних параметрів процесу.

Об'єкт досліджень – технологію екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa*.

Предмет досліджень – технологічні параметри процесу екстрагування полісахаридів субкритичною водою, вміст білку, в'язкість, антиоксидантна активність полісахаридів.

Для досягнення мети дослідження ми сформулювали завдання, які потрібно вирішити:

- дослідити вплив температури екстракції на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;
- дослідити вплив часу екстракції на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;
- дослідити вплив співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів при екстракції грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою;
- провести порівняння ефективності екстрагування полісахаридів субкритичною водою та традиційним екстрагуванням мацерацією гарячою водою;
- проаналізувати антиоксидантну активність полісахаридів, отриманих субкритичною водою та мацерацією з антиоксидантною активністю аскорбінової кислоти як контрольного зразка;
- запропонувати та обґрунтувати раціональні параметри екстрагування грибів *Grifola frondosa* субкритичною водою.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали та реагенти

Гриб *G. Frondosa* було придбано на місцевому ринку. Плодові тіла сушили в сушильній шафі при 60 °C протягом 24 год, а потім подрібнювали в порошкоподібну форму (200 мкм) за допомогою млина. Всі використані розчинники та хімічні речовини були аналітичної чистоти. Як екстракційний розчинник у цьому експерименті використовувалася дистильована вода.

2.2. Апарат екстрагування субкритичною водою

Експериментальні дослідження процесів екстрагування були проведені в науково-дослідній лабораторії «Субкритичні технології в харчових виробництвах» ПДАУ (Рис. 2.1 та 2.2).

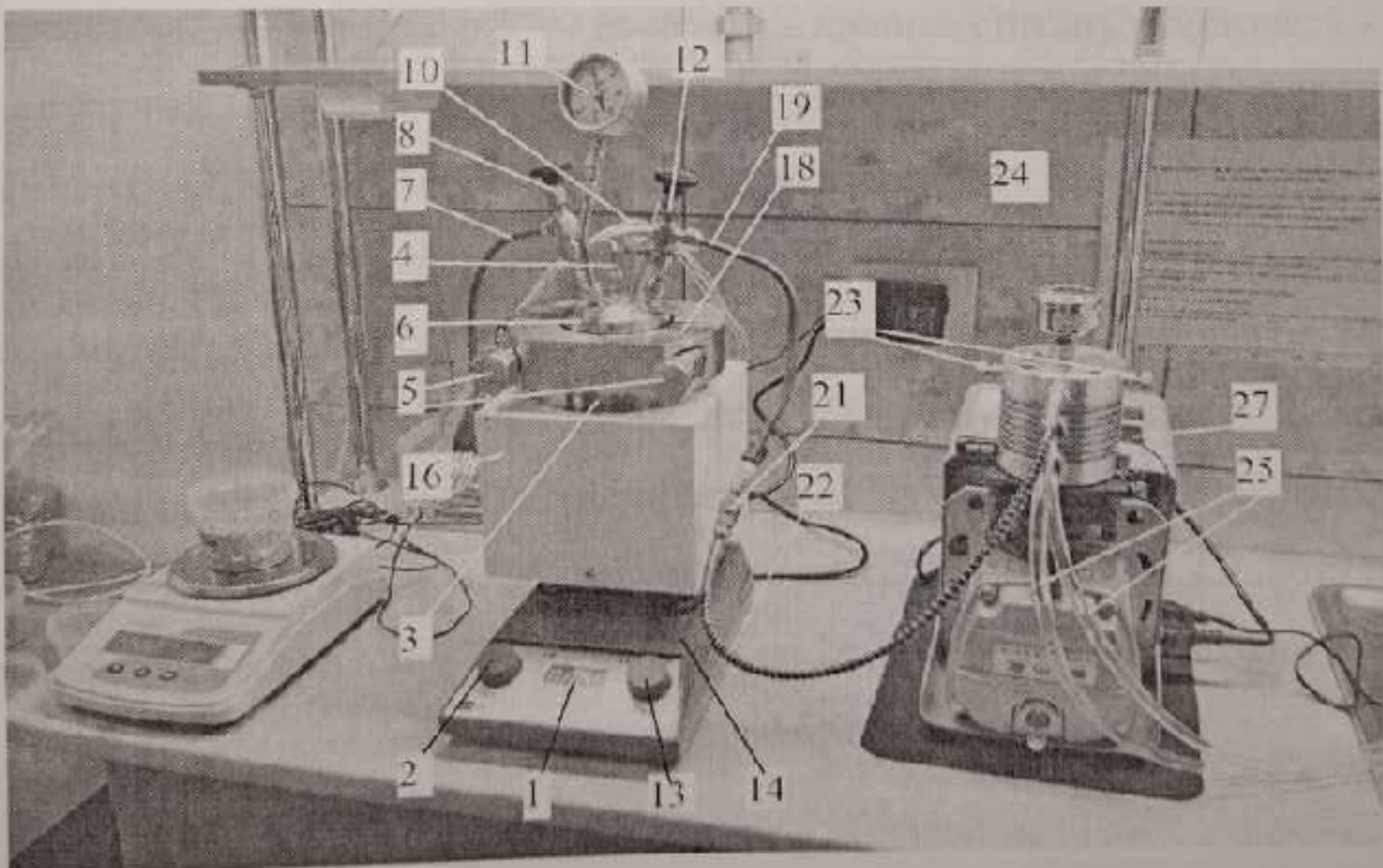


Рис. 2.1. Фотографічне зображення установки для отримання екстрактів в середовищі субкритичної води

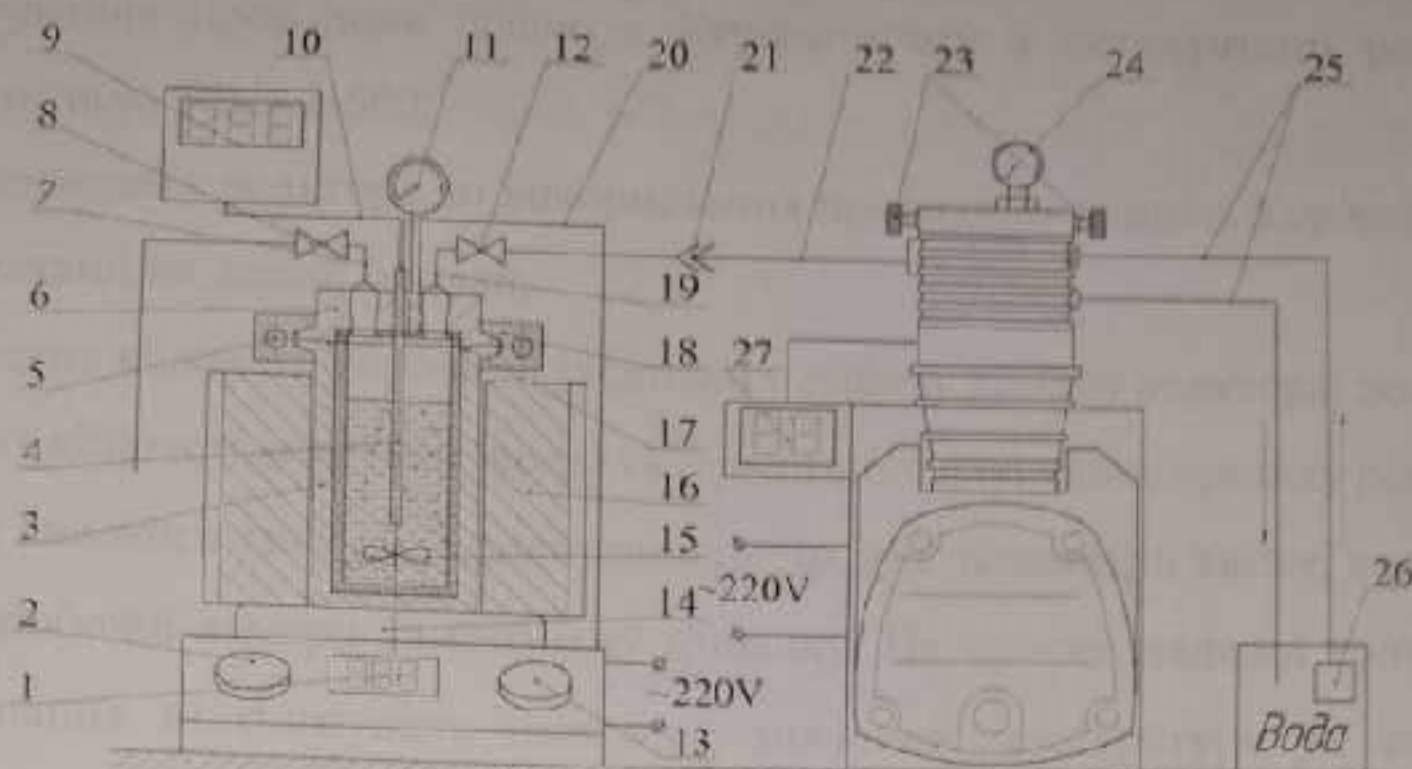


Рис. 2.2. Принципова схема установки для отримання екстрактів в середовищі субкритичної води

1 - дисплей магнітної мішалки; 2 - регулятором температури; 3 - стакан реактора; 4 - термопара; 5 - гвинти; 6 - кришка стакану реактора; 7 - спускний канал; 8 - вентиль спускного каналу; 9 - додатковий датчик температур; 10 - провід додаткового датчика температури; 11 - манометр реактора; 12 - вентиль впускного каналу; 13 - регулятор магнітної мішалки; 14 - магнітна мішалка з підігрівом; 15 - елемент магнітної мішалки; 16 - термоблок; 17 - прокладка фторопластова; 18 - хомут; 19 - впускний канал; 20 - провід основного датчика температури; 21 - з'єднання високого тиску; 22 - шланг високого тиску; 23 - спускні гвинти компресора; 24 - манометр компресора; 25 - водопровід охолодження; 26 - насос системи охолодження компресора; 27 - датчик температури компресора.

2.3. Методика екстрагування субкритичною водою

Для екстрагування сировини у середовищі субкритичної води було використано реактор високого тиску РВД-2-500, що забезпечує наступні параметри екстрагування: температура – до 220 °С, тиск – до 20 МПа.

Екстрагування проводили згідно з Керівництвом з експлуатації реактора високого тиску РВД-2-500.

Підготовку реактора до використання проводили згідно з Керівництвом з експлуатації на даний прилад.

Задану кількість сировини засипали у робочу камеру реактора, доливали необхідну кількість реагенту (вода) та герметично фіксували кришку реактора. Насосом високого тиску забезпечували необхідні параметри тиску, включали розігрів робочої камери та магнітну мішалку. На протязі заданої тривалості екстрагування підтримували необхідні значення температури та тиску у робочій камері. Після закінчення встановленої тривалості екстрагування вимикали підігрів робочої камери та після охолодження робочої камери до температури нижчої 95°C повільно спустити тиск з робочої камери та відкривали кришку та зливали отриманий екстракт.

Після екстракції реактор охолоджували водопровідною водою до температури нижче 30°C . Зразок екстрагували двічі субкритичною водою. Після фільтрації та центрифугування для видалення нерозчинних у воді фракцій, супернатанти концентрували на роторному випарнику при зниженому тиску, потім осаджували EtOH (5: 1, об./об.) при 4°C протягом 12 годин і потім центрифугували при 5000 g протягом 10 хвилин. Осад ліофілізували для отримання екстрактів полісахаридів.

2.4. Апарат екстрагування мацерацією

При проведенні екстрагування методом мацерації було використано перколятор електричний лабораторний (рис. 2.3).

2.5. Методика екстрагування мацерацією

10 г висушеного порошку *G. frondosa* екстрагували 200 мл окропу протягом 3 годин. Після триразового повторення екстракції екстракт фільтрували. [22]. Через 24 год надосадову рідину зливали, фільтрували через тканину з мусліну та зберігали у пляшці бурштинового кольору. Розчин

центрифугували при 8000 об/хв протягом 10 хв. Нарешті, розчин надосадової рідини ліофілізували і висушений екстракт зберігали при 5 °C для подальших досліджень.



Рис. 2.3. Перколятор електричний лабораторний

2.6. Методика визначення загального полісахариду та загального білка

Фенол-сірчаноокислий метод був використаний для вимірювання загального полісахариду з використанням глюкози як стандарт. [36] Концентрація білка визначалася з використанням методу аналізу Бредфорда [37], а бичачий сироватковий альбумін (БСА) використовувався як стандарт для побудови калібрувальна крива.

2.7. Аналіз антиоксидантної активності полісахаридів in vitro

2.7.1. Зниження потужності

Зниження потужності було визначено з використанням описаного методу [38] з деякими невеликими змінами. Аліквоту кожного зразка

змішували з буфером натрій-фосфатним (0,2 М, рН 6,6) до 2,5 мл. Після цього додавали 2,5 мл 1% (мас./об.) розчину $K_3Fe(CN)_6$ і суміш інкубували на водяній бані при температурі 50 °С протягом 20 хвилин. Після додавання 2,5 мл 10% трихлороцтової кислоти супернатант (2,5 мл) потім видаляли та об'єднували з 2,5 мл H_2O та 0,5 мл 0,1% хлориду заліза з подальшим аналізом поглинання при 700 нм. Значення IC_{50} є концентрацією при оптичній щільності 0,5 і аскорбінової кислоти, використаної для порівняння.

2.7.2. Аналіз уловлювання радикалів DPPH

Активність уловлювання радикалів 1,1-дифеніл-2-пікрилгідазил (DPPH) визначали з використанням описаного методу [39] з невеликими модифікаціями. Аліквоту (2,0 мл) кожного зразка (з необхідним розведенням) додавали до 2,0 мл етанольного розчину DPPH. Після 30 хв інкубації за нормальної кімнатної температури в темряві оптичну щільність зчитували за контрольним зразком при 517 нм. Концентрацію зразка з 50%-ним інгібуванням (IC_{50}) визначали за графіком, що показує відсоток інгібування залежно від концентрації екстракту. Для порівняння використали аскорбінову кислоту. Ефект уловлювання радикалів DPPH розраховували з використанням наступного рівняння:

$$\text{Ефект уловлювання Scavenging effect (\%)} = [1 - (A - A_i)/A_0] \times 100\% \quad (2.1)$$

2.8. Статистичний аналіз результатів експериментів

Дані були представлені як середнє $\pm$ стандартне відхилення (стандартне відхилення) трьох визначень. Статистичні розрахунки проводилися у програмі для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Обґрунтування значень параметрів екстрагування мацерацією та субкритичною водою

Порівняльний аналіз технологій екстрагування методами мацерації, та субкритичною водою показав, що кожній з цих технологій притаманні свої раціональні параметри екстрагування, що забезпечують максимальний вихід цільових речовин (Розділ 1).

Аналіз апріорної інформації дозволив нам визначити діапазон варіювання параметрів екстрагування для кожного з досліджуваних методів.

Так, тривалість екстрагування методом мацерації може продовжуватися до 24 годин. Тривалість екстрагування субкритичною водою – до 30 хвилин.

Раціональні значення фракції визначали при дослідженні виходу сухих речовин з 3-х розмірів фракції 0,5; 1,0; 1,5 мм.

Для визначення впливу тиску у робочій камері реактора високого тиску та розміру фракції сировини та вихід сухих речовин було проведено серію попередніх експериментальних досліджень при незмінних значеннях перших трьох параметрів. Враховуючи обставини, що для знаходження води у рідкому стані потрібен додатковий тиск 2 МПа, початковою точкою у даних дослідженнях прийнятий тиск саме 2 МПа.

Аналіз апріорної інформації про параметри процесу субкритичного екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини дозволив визначити діапазон варіювання параметрів процесу екстрагування: температура – від 125 до 200 °С; тривалість процесу – від 15 до 30 хв.; розмір фракції – 0,5±0,1 мм; тиск – 4-8 МПа; гідромодуль (співвідношення маси сировини до маси розчинника) – від 1: 15 до 1: 25.

Під час підготовки сировини та екстрагента відміряти на вагах задану вимогами експерименту порцію сировини; деіонізовану або бідистильовану воду розігріти до 95 °С, відміряти на вагах необхідну кількість для заданого гідромодуля.

Екстрагування гарячою водою проводили протягом 3 годин. Температура екстрагування мацерацією – кімнатна, 25 °С. Після триразового повторення екстракції екстракт фільтрували.

3.2. Дослідження впливу температури екстракції на вихід полісахаридів

Серед технологічних параметрів процесу екстрагування (температура, тиск, тривалість процесу екстрагування, гідромодуль та фракційний склад сировини) температура має найбільший вплив на ефективність процесу та показники екстрагованої речовини. Тому, на першому етапі дослідження, було проведено серію експериментів з визначення впливу саме температури на вихід полісахаридів, які були прийняті як цільова речовина у даному дослідженні. Результати досліджень наведені в табл. 3.1. та на рис. 3.1.

Як показано на Рис. 3.1, температура екстракції надавала позитивний вплив на вихід полісахаридів. Параметри екстракції, що використовуються в цьому випадку, включали час екстракції 30 хв при співвідношенні води до зразка 20: 1. Завдяки желатинізації полісахаридів при температурі 230 °С максимальна очікувана температура склала 230 °С. Вихід полісахаридів при екстракції значно збільшився з 6,9% до 32,8% при підвищенні температури зі 100 °С до 230 °С. Підвищений вихід полісахаридів, ймовірно, був пов'язаний з підвищенням температури води та високим тиском, який міг знизити її поверхневий натяг і збільшити швидкість дифузії з твердої фази в рідку [40]. Параметр тиску при субкритичному екстрагуванні також позитивно впливає на руйнування клітинної стінки сировини [41].

Таблиця 3.1

Вплив температури екстракції на вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою

Температура екстрагування, °С	100	120	150	180	210	230
Вихід полісахаридів, %	7,02	7,98	9,25	14,08	21,54	33,72

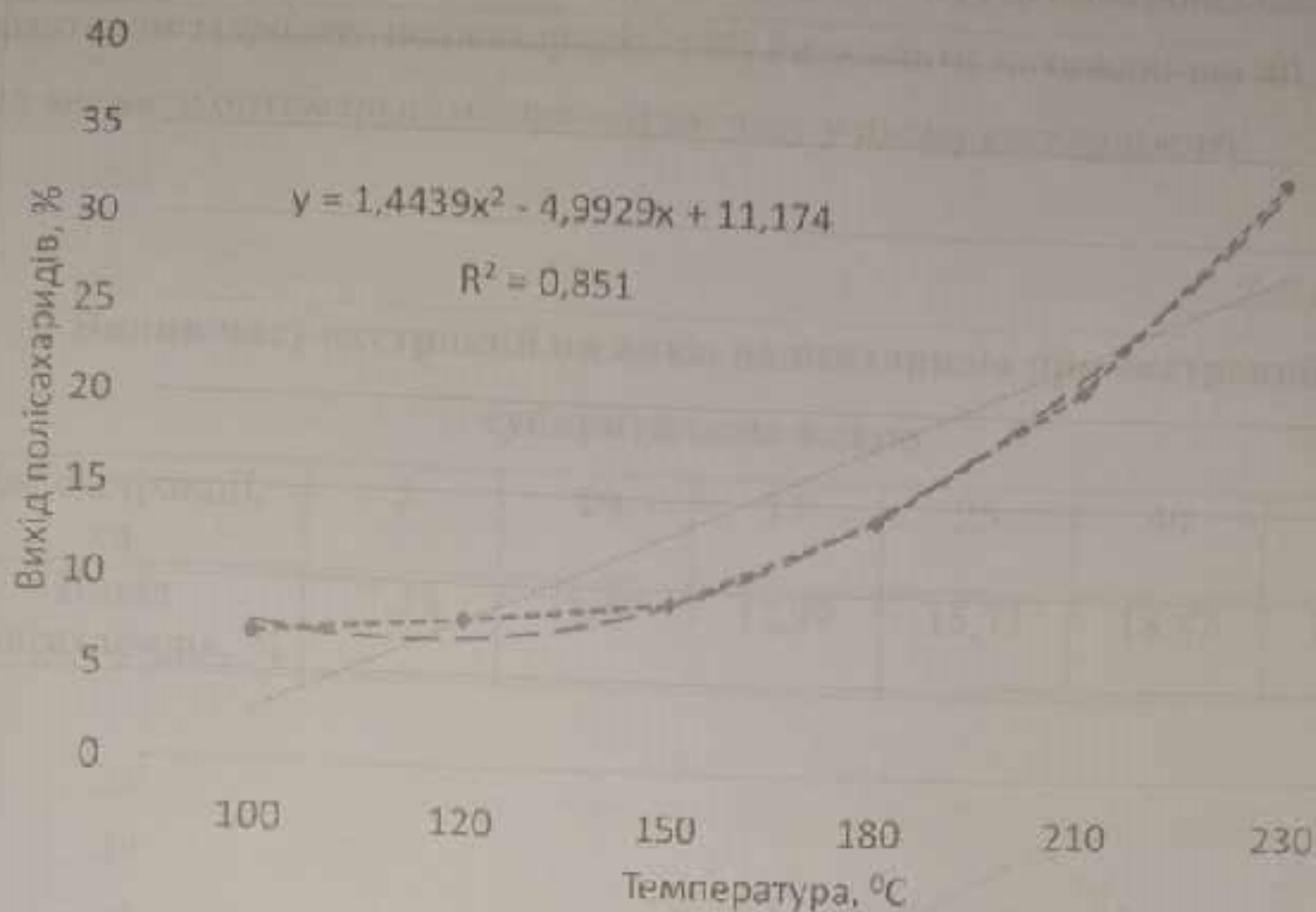


Рис 3.1. Вплив температури екстракції на вихід полісахаридів при екстракції

3.3. Дослідження впливу часу екстракції на вихід полісахаридів

Час екстракції був ще одним важливим фактором, який впливає на вихід полісахаридів. Дослідження показали, що тривалий час екстракції сприяє виробництву полісахаридів [42, 43]. Враховуючи результати аналогічних досліджень [43], тривалість субкритичного екстрагування було обрано до 60 хвилин. Враховуючи фізику процесу субкритичного екстрагування було обрано наступні інтервали проведення замірів параметрів: 5-10-15-25-40-60 хвилин.

Інші параметри екстракції включали температуру екстракції 180 °C і співвідношення води до зразка 20: 1. Результати досліджень наведені в табл. 3.2. та на рис. 3.2. Аналіз отриманої залежності (Рис. 3.2) вказує на те, що вихід полісахаридів значно збільшився з 7,4% до 17,9% зі збільшенням часу екстракції з 5 до 40 хв. Однак при безперервному збільшенні часу реакції вихід

полісахаридів при екстракції знижувався. Це могло бути пов'язане з частковим характером гідролізу полісахаридів. [44] Результати показали, що 40 хвилин слід вважати оптимальним параметром часу у цьому експерименті.

Таблиця 3.2

Вплив часу екстракції на вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою

Час екстракції, хв.	5	10	15	25	40	60
Вихід полісахаридів, %	7,18	11,87	12,99	15,73	18,87	14,98

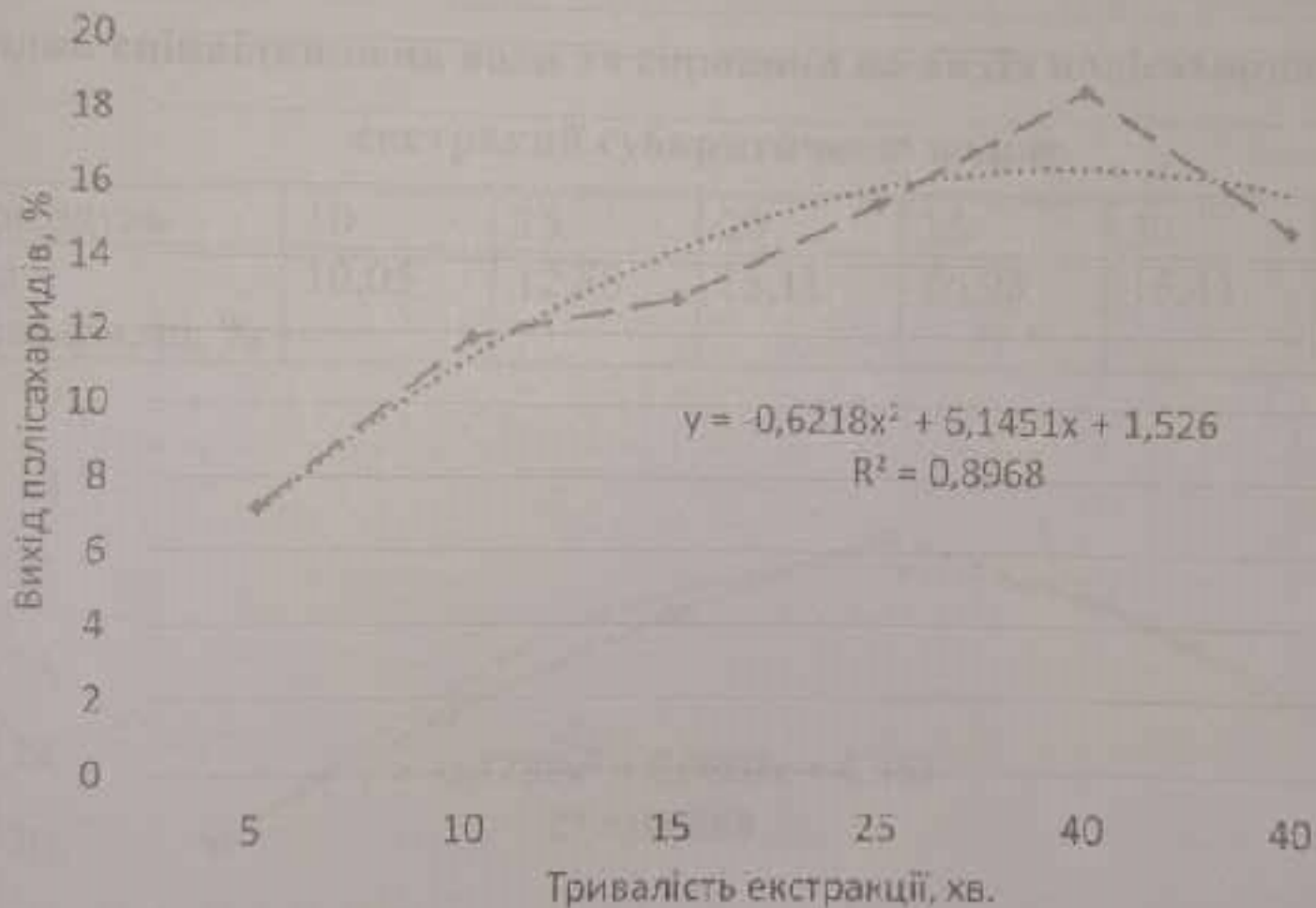


Рис 3. Вплив часу екстракції на вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою

3.4. Дослідження впливу співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів

Результати досліджень впливу гідромодуля (співвідношення води та сировини) на вихід полісахаридів при субкритичному екстрагуванні наведені у табл. 3.3. та на рис. 3.3.

При співвідношенні води до зразка, яке було збільшено з 10:1 до 35:1, інші експериментальні умови, включаючи температуру екстракції 180 °C та час екстракції 30 хв, залишалися постійними. Було встановлено, що при збільшенні співвідношення води до зразка з 10: 1 до 25: 1, вихід цільової речовини відповідно збільшився з 10,1% до 15,5% і досяг максимуму в результаті збільшення рушійної сили молекул розчинника, що збільшуються [45, 46]. Подальше збільшення співвідношення води до зразка до 35: 1 призвело до зменшення виходу цільової речовини. Таким чином, співвідношення води до сировини (25: 1) у цьому експерименті слід вважати оптимальним.

Таблиця 3.3

Вплив співвідношень води та сировини на вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою

Гідромодуль	10	15	20	25	30	35
Вихід полісахаридів, %	10,05	12,88	15,11	16,93	15,43	12,51

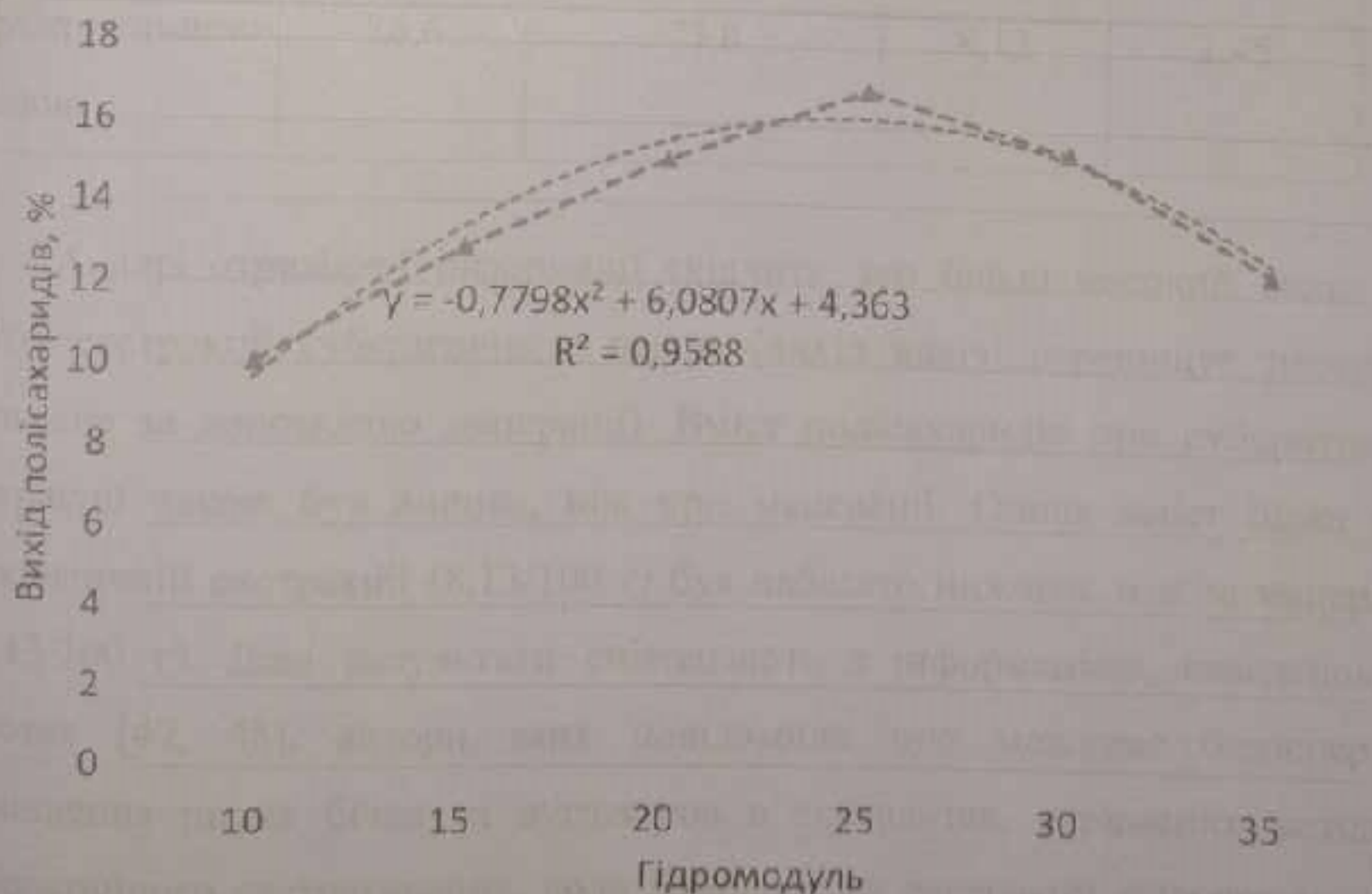


Рис 3.3. Вплив гідромодуля (співвідношень води та сировини) на вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою

3.5. Порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації

З метою порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації було визначено для кожного з методів екстрагування загальний вихід, %; вміст полісахаридів, %; вміст білку, % та в'язкість екстрактів, мПа·с. Фізичні властивості та визначення вмісту полісахаридів, екстрагованих з *G. frondosa*, двома методами наведено у табл. 3.4. та на рис. 3.4.

Таблиця 3.4

**Фізичні властивості та визначення вмісту полісахаридів,
екстрагованих з *G. frondosa***

Метод екстрагування	Загальний вихід, %	Вміст полісахаридів, %	Вміст білку, %	В'язкість, МПа·с
Гарячою водою	11,8	65,2	21,13	3,40
Субкритичною водою	26,6	73,8	8,13	3,45

Аналіз отриманої інформації свідчить, що більш високий вихід дає метод екстракції субкритичною водою (вихід вдвічі перевищує значення, отримане за допомогою мацерації). Вміст полісахаридів при субкритичній екстракції також був вищим, ніж при мацерації. Однак вміст білка при субкритичній екстракції (8,13/100 г) був набагато нижчим, ніж за мацерації (21,13/100 г). Дані результати співпадають з інформацією, наведеною у роботах [47, 48], автори яких повідомили про можливе безперервне підвищення рівнів білка та вуглеводів в екстрактах, отриманих методом субкритичного екстрагування, коли температура екстракції збільшувалася в діапазоні 100–160 °C.

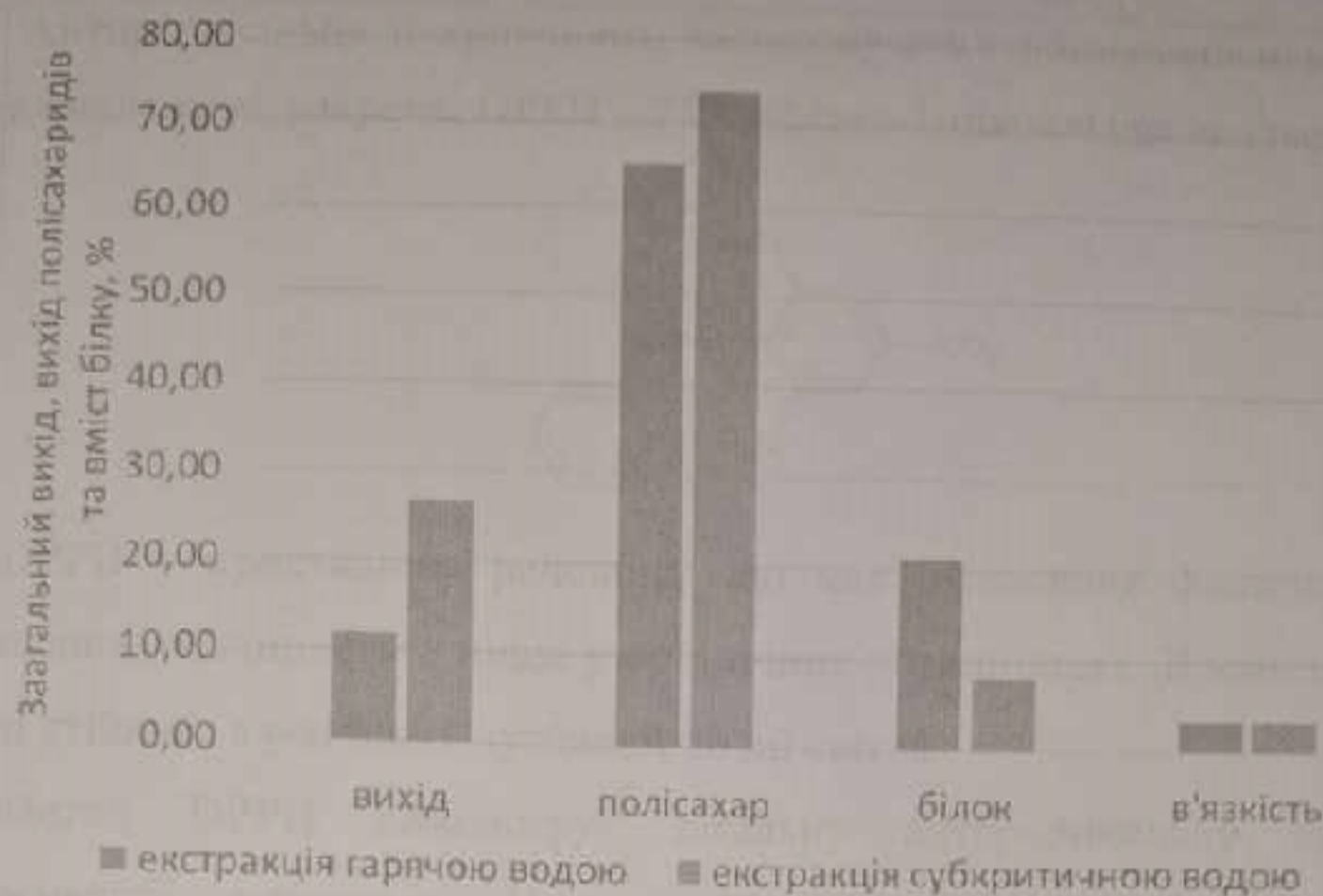


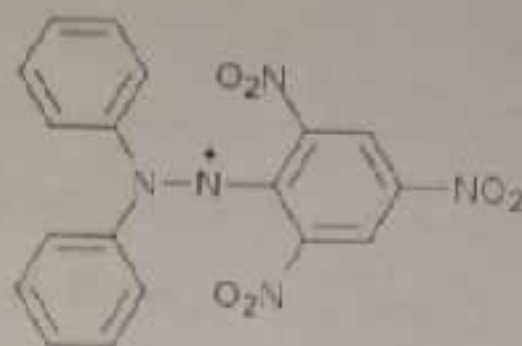
Рис. 3.4. Фізичні властивості та визначення вмісту полісахаридні екстрактів, отриманих мацерацією та субкритичною водою

Проте вміст білка знизився при подальшому підвищенні температури під час екстрагування субкритичною водою. Причина може полягати в тому, що реакція Майяра (реакція цукрів, що відновлюють, з амінокислотами, що розкладаються з білка) відбувалася зі збільшенням температури і часу. [34, 49] Крім того, час, що використовується для екстракції субкритичною водою (43,8 хв), був меншим, ніж екстракція мацерацією (9 год). В'язкості полісахаридів, екстрагованих при субкритичній екстракції та мацерацією склали як 3,45 та 3,40 МПа·с (2 мг/мл) та суттєво не відрізнялися. Цей факт ми пояснили тими обставинами, що молекулярна маса полісахаридів мало залежить від параметрів процесу субкритичного екстрагування.

3.6. Дослідження антиоксидантної активності екстрактів

Антиоксидантна активність у харчових технологіях характеризує уповільнення псування жирів у харчових продуктах, що пов'язується, передусім, зі здатністю речовини поглинати вільні радикали.

Антирадикальну дію вивчають, застосовуючи стабільні вільні радикали, до яких належить, зокрема, DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал:



DPPH – кристалічна речовина, що має інтенсивне фіолетово-чорне забарвлення, розчиняється лише у органічних розчинниках. В кристалічному вигляді стійкий, в розчинах чутливий до дії світла.

Метод DPPH демонструє загальну антирадикальну активність досліджуваної речовини. Принцип методу полягає у вимірюванні інтенсивності забарвлення спиртового розчину даного стабільного радикалу до і після додавання досліджуваної речовини або суміші речовин. Спиртовий розчин DPPH має пурпурно-синє забарвлення, при додаванні нього розчину речовини з радикал-поглинаючою активністю радикал відновлюється. Відновлена форма має світло-жовте забарвлення, відповідно інтенсивність забарвлення розчину зменшується пропорційно до зменшення концентрації вільного радикалу.

Оптична густина розчину вимірювали спектрофотометрично, при довжинах хвиль від 500 до 550 нм, оскільки саме при таких довжинах хвиль різниця в поглинанні світла між початковою і відновленою формами DPPH є найбільшою. Порівняння величин оптичної густини контрольного розчину, що містить лише невідновлений радикал, і досліджуваних розчинів дозволило обчислити відсоток інгібування забарвлення DPPH, на його основі – побудувати графік залежності величин інгібування забарвлення від концентрації досліджуваної речовини. За графіком встановлювали така концентрація речовини, котра викликає 50% інгібування забарвлення вільного радикалу - EC_{50} . Дана величина є кількісним виразом антиоксидантної

активності речовини або суміші речовин (екстракту) і дозволяє порівнювати між собою здатність різних речовин до вловлювання вільних радикалів.

При дослідженні антиоксидантних властивостей екстрактів слід розрізняти поняття показників IC_{50} та EC_{50} . EC_{50} – це концентрація екстракту, що дає половину максимального ефекту. IC_{50} – це концентрація інгібітору, за якої зв'язування вільних радикалів знижується вдвічі.

EC_{50} – ефективна концентрація; концентрація, при якій аналізована речовина має певний ефект на 50% оброблених зразків.

EC_{50} : ефективна концентрація речовини, дія якої відповідає 50% максимальної реакції;

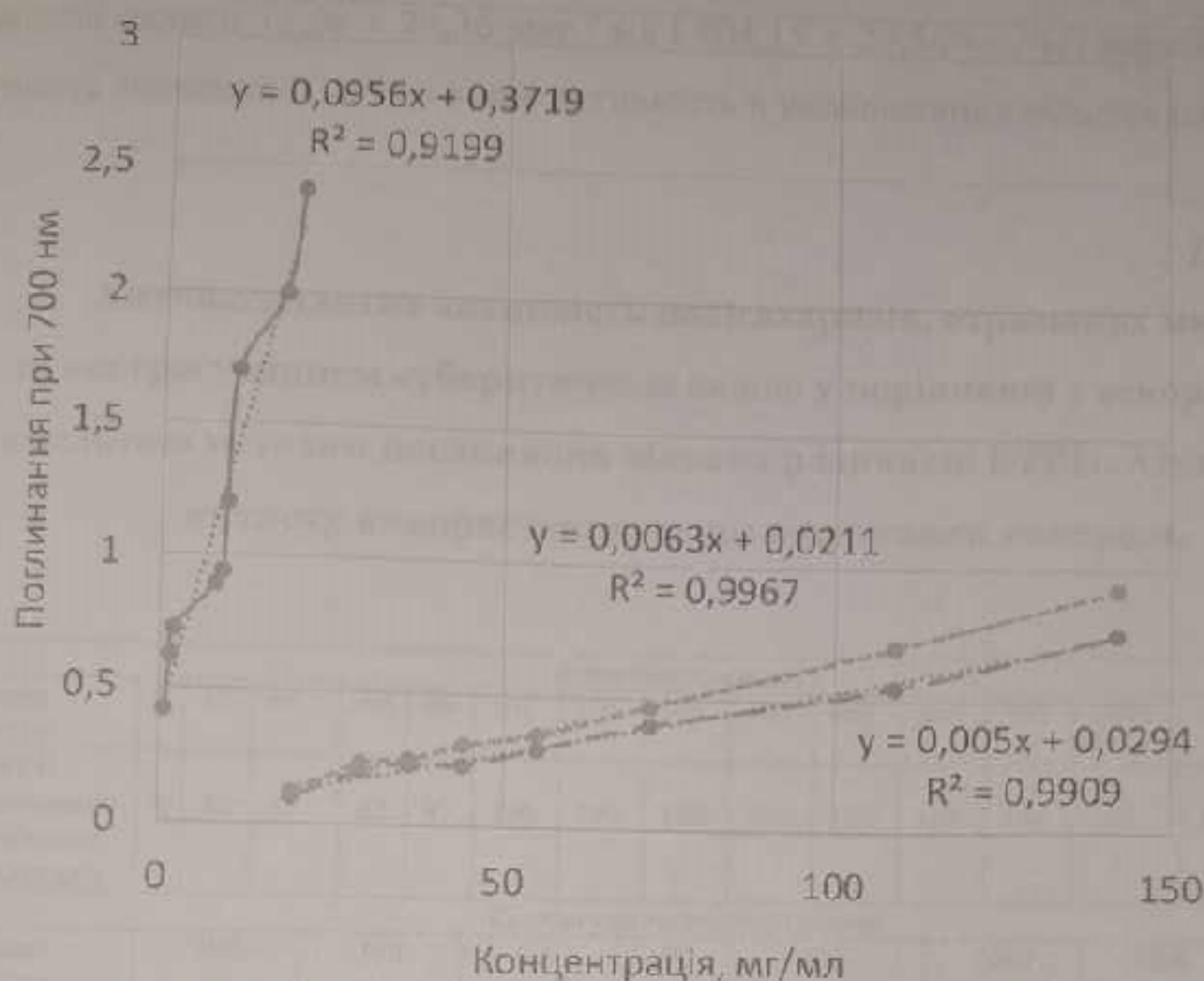
IC_{50} – середня інгібуюча концентрація (IC_{50}) є концентрацією інгібітора, при якій спостерігається напівмаксимальне інгібування.

Відновлювальна здатність є значним відображенням антиоксидантної активності в оцінці потенційних антиоксидантів. Антиоксидантні сполуки викликають відновлення форми тривалентного заліза (Fe^{3+}) до форми двовалентного заліза (Fe^{2+}) внаслідок їхньої відновлювальної здатності. Зменшення може бути визначено шляхом виміру утворення берлінської сині Перла на довжині хвилі 700 нм. Результати вимірювань наведені у табл. 3.5 та на рис. 3.5.

Таблиця 3.5

Залежність відновлюваної здатності екстрактів від концентрації

Аскорбінова кислота									
Конц., мг/мл	0,7	1,5	2	8	9	9,5	10,8	17,5	19,9
Поглинання при 700 нм	0,42	0,62	0,72	0,89	0,94	1,2	1,7	2,0	2,4
Екстрагування гарячою водою (мацеранія)									
Конц., мг/мл	19	29	36	44	55	72	109	142	
Поглинання при 700 нм	0,1	0,2	0,23	0,23	0,30	0,40	0,55	0,75	
Екстрагування субкритичною водою									
Конц., мг/мл	19	29	36	44	55	72	109	142	
Поглинання при 700 нм	0,12	0,23	0,25	0,31	0,35	0,47	0,70	0,92	



- - аскорбінова кислота;
- - -●- - екстрагування гарячою водою;
-●..... - екстрагування субкритичною водою.

Рис. 3.5. Антиоксидантна активність полісахаридів, отриманих мацерацією та екстрагуванням субкритичною водою у порівнянні з аскорбіновою кислотою як залежність відновлюваної здатності екстрактів від концентрації

Як показано на рис. 3.5, антиоксидантна активність полісахаридів, вилучених екстрагуванням субкритичною водою була вищою, ніж при екстрагуванні мацерацією, що могло бути результатом антиоксидантних компонентів, що утворилися під час екстрагування субкритичною водою. [31, 47] IC_{50} був розрахований і вказаний в таблиці 3.6. Значення IC_{50} поглинання

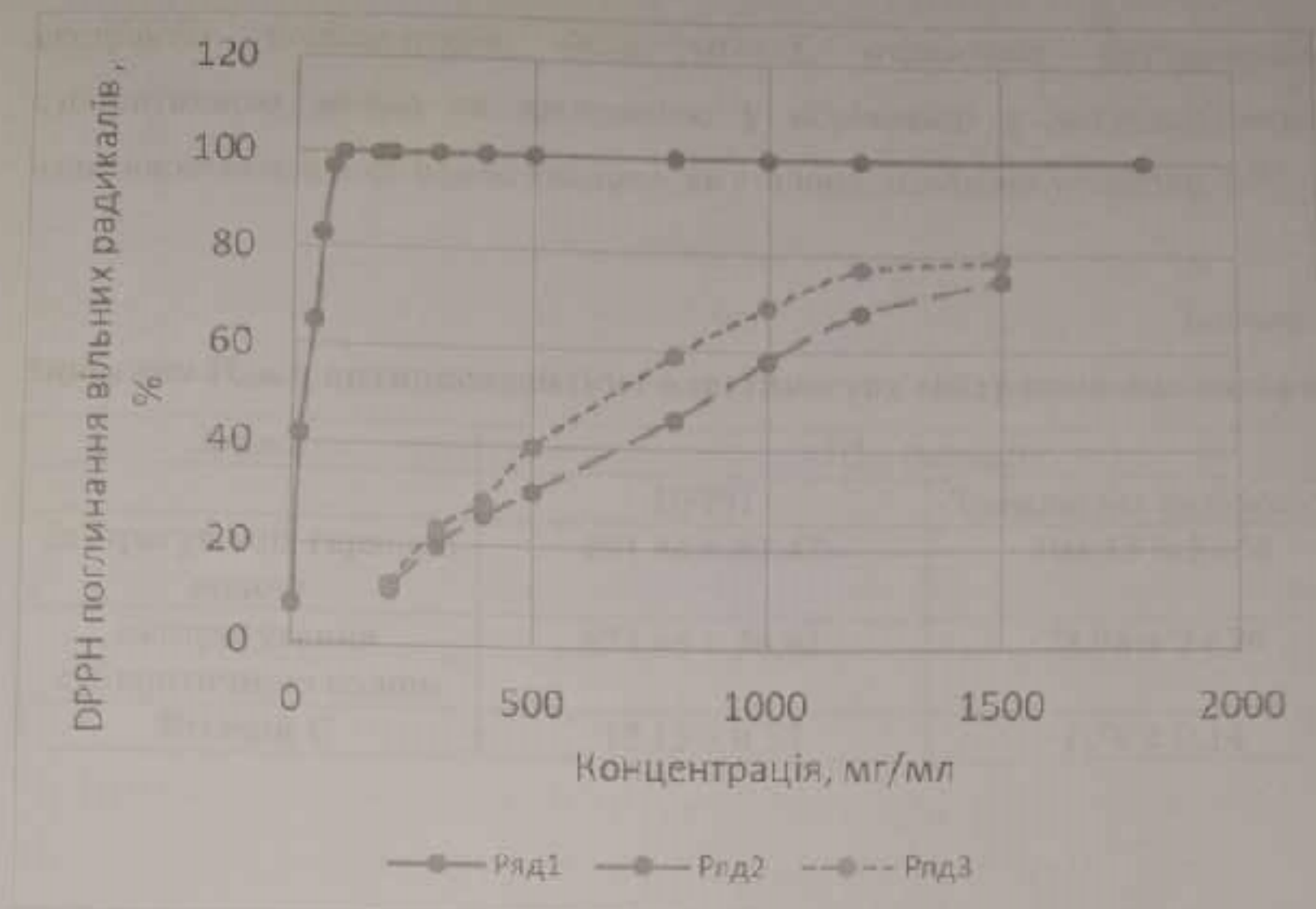
полісахаридів, отриманих при субкритичній екстракції та екстракції гарячою водою склали $78,98 \pm 24,36$ мкг / мл і $104,15 \pm 27,58$ мкг/мл відповідно. Чим нижче значення IC_{50} тим вище активність з уловлювання вільних радикалів.

Таблиця 3.6

Антиоксидантна активність полісахаридів, отриманих мацерацією та екстрагуванням субкритичною водою у порівнянні з аскорбіновою кислотою методом поглинання вільних радикалів DPPH. Аскорбінова кислоту використовували як позитивний контроль

Конц., мг/мл	Аскорбінова кислота														
	0	15	45	60	80	100	175	200	300	400	500	800	1000	1200	1800
DPPH поглинання вільних радикалів	8	42	65	83	97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Конц., мг/мл	Екстрагування гарячою водою														
	200	300	400	500	800	1000	1200	1500							
DPPH поглинання вільних радикалів, %	11	20	26	31	46	58	68	75							
Конц., мг/мл	Екстрагування субкритичною водою														
	200	300	400	500	800	1000	1200	1500							
DPPH поглинання вільних радикалів, %	12	23	29	40	59	69	77	79							

Вільний радикал DPPH, який є стабільним радикалом з максимальним поглинанням при 517 нм, широко застосовується для оцінки загальної антиоксидантної активності природних сполук. Відповідно, даний показник було використано для оцінки загальної антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів також у порівнянні з антиоксидантною активністю аскорбінової кислоти. Результати досліджень наведені в табл. 3.6. та на рис. 3.6.



- Ряд1 - аскорбінова кислота;
- Ряд2 - екстрагування гарячою водою;
- Ряд3 - екстрагування субкритичною водою.

Рис.3.5. Антиоксидантна активність полісахаридів, отриманих мацерацією та екстрагуванням субкритичною водою у порівнянні з аскорбіновою кислотою виміряна методом поглинання вільних радикалів DPPH. Аскорбінова кислоту використовували як позитивний контроль. Дані представлені як середнє значення при $n = 3$

Здатність поглинання вільних радикалів DPPH екстрактами полісахаридів, отриманих як субкритичним екстрагуванням, так і методом ацерації зростала зі збільшенням концентрації зразків екстракту. Значення IC_{50} активності полісахаридів з уловлювання радикалів DPPH при субкритичному екстрагуванні та мацерацією склали $674,68 \pm 36,83$ мкг/мл і $881,44 \pm 43,47$ мкг/мл, відповідно. Зведена інформація про антиоксидантні властивості

екстрактів полісахаридів (IC_{50} мг/мл), отриманих екстрагуванням субкритичною водою та мацерацією у порівнянні з антиоксидантними властивостями аскорбінової кислоти, як еталону, наведена у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Значення IC_{50} в антиоксидантних властивостях екстрактів полісахаридів

Зразки	IC_{50} (мг/мл)	
	DPPH	Зменшення потужності
Екстрагування гарячою водою	881.44 ± 43.47	104.15 ± 27.58
Екстрагування субкритичною водою	674.68 ± 36.83	78.98 ± 24.36
Вітамін С	12.15 ± 0.32	1.76 ± 0.14

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

Аналіз наявної науково-технічної інформації підтвердив, що робота, спрямована на вдосконалення технології екстрагування полісахаридів з грибів *Grifola frondosa* шляхом використання субкритичної води та отримання раціональних параметрів процесу є актуальною.

Комплекс експериментальних досліджень передбачав обґрунтування значень параметрів екстрагування мацерацією та субкритичною водою; дослідження впливу температури екстракції на вихід полісахаридів; дослідження впливу часу екстракції на вихід полісахаридів; дослідження впливу співвідношення води та зразка на вихід полісахаридів; порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації та дослідження антиоксидантної активності екстрактів.

Результати експериментів було оброблено методами математичної статистики та описано відповідними математичними функціями.

Аналіз отриманих результатів дозволив встановити наступне.

Вихід полісахаридів при екстракції субкритичною водою значно збільшився з 6,9% до 32,8% при підвищенні температури зі 100 °C до 230 °C. Підвищений вихід полісахаридів, ймовірно, був пов'язаний з підвищенням температури води та високим тиском, який міг знизити її поверхневий натяг і збільшити швидкість дифузії з твердої фази в рідку. Параметр тиску при субкритичному екстрагуванні також позитивно впливає на руйнування клітинної стінки сировини.

Вихід полісахаридів значно збільшився з 7,4% до 17,9% зі збільшенням часу екстракції з 5 до 40 хв. Доведено, що 40 хвилин слід вважати оптимальним параметром часу при субкритичному екстрагуванні.

При збільшенні співвідношення води до зразка з 10: 1 до 25: 1 вихід цільової речовини відповідно збільшився з 10,1% до 15,5% і досяг максимуму в результаті збільшення рушійної сили молекул розчинника, що збільшуються. Подальше збільшення співвідношення води до зразка до 35: 1 призвело до

зменшення виходу цільової речовини. Таким чином, співвідношення води до сировини (25: 1) слід вважати оптимальним.

З метою порівняння ефективності екстрагування субкритичною водою та методом мацерації було визначено для кожного з методів екстрагування загальний вихід, %; вміст полісахаридів, %; вміст білку, % та в'язкість екстрактів. Аналіз отриманої інформації свідчить, що більш високий вихід дає метод екстракції субкритичною водою (вихід вдвічі перевищує значення, отримане за допомогою мацерації). Вміст полісахаридів при субкритичній екстракції також був вищим, ніж при мацерації. Однак вміст білка при субкритичній екстракції (8,13/100 г) був набагато нижчим, ніж за мацерації (21,13/100 г).

Доведено, що антиоксидантна активність полісахаридів, вилучених екстрагуванням субкритичною водою була вищою, ніж при екстрагуванні мацерацією.

Результати досліджень можуть бути рекомендована для впровадження на підприємствах харчових галузей.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Innovative Processing Technologies for Foods with Bioactive Compounds. Edited By Jorge J. Moreno. Published July 27, 2016 by CRC Press. 325 Pages.
2. Food Antioxidants Technological: Toxicological and Health Perspectives. By D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe. Published September 5, 2019 by CRC Press 512 Pages.
3. E. Betoret, N. Betoret, D. Vidal, Pedro Fito. Functional foods development: Trends and technologies. September 2011 Trends in Food Science & Technology 22(9):498-508.
4. О.О. Шемета, К.М. Дожук. Функціональне харчування – новий підхід до здорового способу життя. Ліки України. №1 (186) / 2015.
5. Wang, L. and Weller, C.L. (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. Trends in Food Science and Technology, 17, 300-312.
6. Lijun Wang and Curtis L. Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 300–312.
7. M. Roberfroid. Functional food concept and its application to prebiotics. Dig Liver Dis. 2002 Sep;34 Suppl 2:S105-10.
8. Stefania Nobili, Donatella Lippi, Ewa Witort, Martino Donnini, Letizia Bausi, Enrico Mini, Sergio Capaccioli. Natural compounds for cancer treatment and prevention. Review Pharmacol Res. 2009 Jun; 59(6):365-78.
9. He X, Wang X, Fang J, Chang Y, Ning N, Guo H, Huang L, Huang X, Zhao Z. Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: A review. Int J Biol Macromol. 2017 Aug;101:910-921.
10. He Y, Zhang L, Wang H. The biological activities of the antitumor drug *Grifola frondosa* polysaccharide. Prog Mol Biol Transl Sci. 2019;163:221-261.
11. Zhang ZQ, Liu LP, Lei L, Wang CN, Tang QL, Wu TX. Antioxidative and Immunomodulatory Activities of the Exopolysaccharides from Submerged Culture of Hen of the Woods or Maitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Grifola frondosa* (Agaricomycetes) by Addition of *Rhizoma gastrodiae* Extract and Its Main Components. Int J Med Mushrooms. 2019;21(8):825-839.

12. *Grifola frondosa* // Mycobank.org. — CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center Utrecht, 2016.
13. Fan Y, Wu X, Zhang M, Zhao T, Zhou Y, Han L, et al. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from *Grifola frondosa*. *Int J Biol Macromol*. 2011;48:798–803.
14. Mau J-L, Chang C-N, Huang S-J, Chen C-C. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chem*. 2004;87:111–8.
15. Cui FJ, Tao WY, Xu ZH, Guo WJ, Xu HY, Ao ZH, et al. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresour Technol*. 2007;98:395–401.
16. Mori K, Kobayashi C, Tomita T, Inatomi S, Ikeda M. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr Res*. 2008;28:335–42.
17. Chi A-P, Chen J-P, Wang Z-Z, Xiong Z-Y, Li Q-X. Morphological and structural characterization of a polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino and its anti-exercise fatigue activity. *Carbohydr Polym*. 2008;74:868–74.
18. Zhang HL, Li J, Li G, Wang DM, Zhu LP, Yang DP. Structural characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from the roots of *Morinda officinalis*. *Int J Biol Macromol*. 2009;44:257–61.
19. Švagelj M, Berovič M, Boh B, Menard A, Simčič S, Wraber B. Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) S.F Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular β -polysaccharides. *N Biotechnol*. 2008;25:150–6.
20. Paradossi G, Cavalieri F, Pizzoferrato L, Liquori AM. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *Int J Biol Macromol*. 1999;25:309–15.

21. Song T, Pranovich A, Holmbom B. Effects of pH control with phthalate buffers on hot-water extraction of hemicelluloses from spruce wood. *Bioresour Technol.* 2011;102:10518–23.
22. Zhang M, Zhang L, Cheung PCK, Ooi VE. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydr Polym.* 2004;56:123–8.
23. Rodriguez-Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, Aguilar CN, Teixeira JA. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr Polym.* 2011;86:1137–44.
24. Yan Y-l, Yu C-h, Chen J, Li X-x, Wang W, Li S-q. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydr Polym.* 2011;83:217–24.
25. Tang X, Yan L, Gao J, Ge H, Yang H, Lin N. Optimization of extraction process and investigation of antioxidant effect of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. *Pharmacogn Mag.* 2011;7:186–92.
26. Zhang J, Jia S, Liu Y, Wu S, Ran J. Optimization of enzyme-assisted extraction of the *Lycium barbarum* polysaccharides using response surface methodology. *Carbohydr Polym.* 2011;86:1089–92.
27. Mortazavi SV, Eikani MH, Mirzaei H, Jafari M, Golmohammad F. Extraction of essential oils from *Bunium persicum* Boiss. using superheated water. *Food Bioprod Process.* 2010;88:222–6.
28. Singh PP, Saldaña MD. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Res Int.* 2011;44:2452–8.
29. Ko M-J, Cheigh C-I, Cho S-W, Chung M-S. Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J Food Eng.* 2011;102:327–33.
30. He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Ž, et al. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed

residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS+ assay. Food Bioprod Process.

31. Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. Food Chem. 2009;114:717–26.
32. Singh PP, Saldaña MD. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. Food Res Int. 2011;44:2452–8.
33. Öztürk İ, Irmak S, Hesenov A, Erbatur O. Hydrolysis of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) stems by catalytical thermal treatment in subcritical water. Biomass Bioenergy. 2010;34:1578–85.
34. Plaza M, Amigo-Benavent M, del Castillo MD, Ibáñez E, Herrero M. Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. Food Res Int. 2010;43:1123–9.
35. Субкритична екстракція біологічно активних речовин із виноградних вичавок: моногр. / В.О. Сукманов, А.І. Українець, В.Л. Зав'ялов та ін. — К.: НУХТ, 2019. — 415 с.
36. Wei X, Chen M, Xiao J, Liu Y, Yu L, Zhang H, et al. Composition and bioactivity of tea flower polysaccharides obtained by different methods. Carbohydr Polym. 2010;79:418–22.
37. Carlsson N, Borde A, Wölfel S, Åkerman B, Larsson A. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. Anal Biochem. 2011;411:116–21.
38. Chung JW, Kim JJ, Kim SJ. Antioxidative effects of cinnamomi cortex: A potential role of iNOS and COX-II. Pharmacogn Mag. 2011;7:314–9.
39. Wintola OA, Afolayan AJ. Phytochemical constituents and antioxidant activities of the whole leaf extract of *Aloe ferox* Mill. Pharmacogn Mag. 2011;7:325–33.
40. Carr AG, Mammucari R, Foster NR. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. ChemEng J. 2011;172:1–17.

41. Gehrke CW, Wixom RL, Bayer E. World Reference Laboratory. Chapter 5 Prominent chromatographers and their research seminal concepts in chromatography/separation sciences. In: Gehrke CW, Bayer E, editors. Journal of Chromatography Library. vol. 64. Elsevier; 2001. pp. 99–599.
42. Tian S, Zhou X, Gong H, Ma X, Zhang F. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharide from *Paeonia sinjiangensis* K.Y. Pan. Pharmacogn Mag. 2011;7:4–8.
43. Wang J, Zhang J, Zhao B, Wang X, Wu Y, Yao J. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. Carbohydr Polym. 2010;80:84–93.
44. Shao Q, Deng Y, Shen H, Fang H, Zhao X. Optimization of polysaccharides extraction from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg using response surface methodology. Int J Biol Macromol. 2011;49:958–62.
45. Ye C-L, Jiang C-J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. Carbohydr Polym. 2011;84:495–502.
46. Liu J, Sun Y, Liu L, Yu C. The extraction process optimization and physicochemical properties of polysaccharides from the roots of *Euphorbia fischeriana*. Int J Biol Macromol. 2011;49:416–21.
47. Cacace JE, Mazza G. Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed. J Food Eng. 2006;77:1087–95.
48. Ho CH, Cacace JE, Mazza G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. LWT - Food Sci Technol. 2007;40:1637–47.
49. Plaza M, Amigo-Benavent M, del Castillo MD, Ibáñez E, Herrero M. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. Food Res Int. 2010;43:2341–8.