

МЕТОДИ

УДК 582.28+581.19+576.345

ІДЕНТИФІКАЦІЯ СКЛАДНИКІВ МОЛОЧНОГО СОКУ ГРИБА *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr ЗА ДОПОМОГОЮ ГАЗОРІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ/МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

М. В. ЦИВІНСЬКА^{1,2}, Л. В. ПАНЧАК³, Р. С. СТОЙКА^{4,1}, В. О. АНТОНЮК^{4,3*}

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
при ДУМВС України у Львівській області;

³Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;

⁴Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: antonyukvo@gmail.com

Запропоновано метод розділення метанольного екстракту базидієм *Lactarius pergamenus* і дослідження фракції, екстрагованої гексаном, яка згідно з результатами попередніх досліджень виявляє найвищу антипроліферативну та противірусну активність. Основну увагу приділено фракціонуванню та аналізу методом газорідинної хроматографії/мас-спектрометрії (ГРХ-МС) екстрагованої гексаном фракції 1.4. Ключову роль у розділенні цієї фракції відіграло застосування діоксану, який добре змішується як з полярними, так і неполярними розчинниками (гексаном, хлороформом, метанолом, водою). Зроблено висновок про повний хімічний склад гексанової фракції метанольного екстракту висушених базидієм *Lactarius pergamenus*. Показано, що ця фракція на 38% складається з вищих жирних кислот та їхніх похідних, на 29% – із фталатів, на 13% – із сесквітерпенів, на 2% – з альдегідів і на 18% – з інших сполук (вуглеводи, спирти, похідні гідразину та неідентифіковані сполуки). Така сукупність речовин дозволяє утворити стійку емульсію молочного соку, який захищає плодове тіло гриба від бактеріальних і грибкових інфекцій та від поїдання ссавцями і комахами.

Ключові слова: базидіюми гриба *Lactarius pergamenus*, екстракція метанолом, гексановий екстракт, хроматографія на силікагелі, газорідинна хроматографія/мас-спектрометрія.

У плодових тілах (базидіомах) грибів роду *Lactarius* міститься безбарвний або забарвлений молочний сік, який виділяється при їх пошкодженні. Однією з функцій цього молочного соку вважається захист базидіюм від поїдання тваринами та від інфікування мікроорганізмами і патогенними грибами. Це забезпечується цілим комплексом речовин, які обумовлюють його гіркоту або пекучий смак, а деякі з них забезпечують його стабільність [1]. Серед грибів України особливо пекучим смаком характеризуються свіжі базидіюми *L. pergamenus*, *L. vellereus*, *L. piperatus*.

Серед метаболітів *Lactarius* найважливішою групою є сесквітерпени, які утворюються з фарнезилпірофосфату. Найбільше серед них похідних протоіудану – трициклического сесквітерпену, здатного до подальших перетворень, внаслідок чого утворюються біцикличесні маразмани сесквітерпени, а далі біцикличесні

азуленові сесквітерпени, які й обумовлюють колір м'якуша і молочного соку у разі пошкодження базидіюм русуляльних грибів [2, 3]. Прикладом пігментних речовин, відповідальних за зміну оранжевого забарвлення молодих базидіюм рижика смачного під час дозрівання на зеленувате, є сесквітерпени – лактаразулен та лактаровіолін [2]. Непошкоджені пекучі базидіюми видів *Russulaceae* містять біологічно неактивні естери жирних кислот велутіналу, наприклад, стеарат велутіналу (похідне маразмани) [4]. За їх пошкодження естери велутіналу швидко перетворюються у маразман ізовелерал, який містить дві альдегідні групи, що й обумовлює його дуже пекучий смак. Ця реакція є ензиматичною і відповідні перетворення не відбуваються *in vitro*. Гриби різних видів *Lactarius* утворюють структурно відмінні сесквітерпени [5]. Так, за ушкодження базидіюм *L. rufus* і *L. quietus* утворюється тільки ізовелерал, у *L. bertillonii* – велерал,

L. vellereus – ізовелерал і велерал, *L. piperatus* і *L. torminosus* – усі форми велералу і піпердіалу, *L. necator* – велерал і епіпіпердіал [4].

Під час висушування базидіом лабільні сесквітерпени перетворюються у стійкіші сполуки, які мають нижчу біологічну активність, але все ж виявляють антимікробну і цитотоксичну дію. Раніше показано, що у висушених базидіомах *Lactarius pergamenus* містяться речовини із цитотоксичною дією щодо лейкомічних клітин [6]. Найвищою активністю характеризувалася фракція метанольного екстракту, вилучена із нього гексаном. Вона містить речовину сесквітерпенової природи із жовто-зеленою флуоресценцією в УФ-світлі і її було ідентифіковано як 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол. Фракціонування цього гексанового екстракту здійснювали виморожуванням для видалення стеаринової кислоти [7], після чого проводили хроматографію на колонці із силікагелем з послідовною елюцією органічними розчинниками. Внаслідок цього одержано шість фракцій із цитотоксичною активністю [6]. Хімічний склад п'яти з них ідентифіковано за допомогою газорідинної хроматографії/мас-спектрометрії (ГРХ/МС), тоді як хімічний склад непроаналізованої шостої (гексанової) фракції виявився дуже складним і потребував додаткового розділення. У той самий час її внесок у сумарний біологічний ефект був достатньо вагомим [6,8]. Дослідження хімічного складу цієї фракції в повному обсязі може допомогти виявити найбільш біологічно активні речовини базидіом цього гриба.

Метою роботи було розробити методику хроматографічного розділення речовин раніше непроаналізованої фракції базидіом *L. pergamenus*, а також вивчити її хімічний склад, використовуючи для цього методи ГРХ/МС.

Матеріали і методи

Базидіоми грибів заготовляли у липні-серпні в період їх масової появи в мішаному лісі Сколівського району Львівської області. Гриби доставляли в лабораторію не пізніше 12 год після їх збирання, подрібнювали на м'ясорубці і пресом витискали сік, який використовували для одержання лектину [9], а шрот, одержаний після витискання соку, висушували в сушильній шафі при 52 °С.

Фракціонування за допомогою розчинників та хроматографії на колонці із силікагелем. Шрот і базидіоми (після висушування) подрібнювали за допомогою побутової

кавомолки та відбирали порошокподібну фракцію ($d < 0,5$ мм), використовуючи відповідне сито, після чого поміщали в апарат Соксклета і протягом 3 год екстрагували метанолом. Розчинник відганяли, а рештки метанолу випаровували в сушильній шафі при 52 °С. Одержаний осад розчиняли в підігрітому до 40–50 °С метанолі до досягнення 30%-ої концентрації, фільтрували і поміщали в морозильну камеру при -18 °С для виморожування основної кількості стеаринової кислоти. Після відділення стеаринової кислоти метанольний екстракт висушували в сушильній шафі при 52 °С. Одержану темно-коричневу густу масу перемішували з гексаном у співвідношенні 1 : 10. Гексановий екстракт освітляли центрифугуванням (операцію повторювали тричі). Потім гексан відганяли, а одержаний екстракт досушували в сушильній шафі при 52 °С до постійної маси. Вона становила $24,7 \pm 2,4\%$, ($n = 5$, $P = 95\%$, $X \pm \Delta X$) від маси початкового метанольного екстракту.

Далі розділення одержаної суміші речовин здійснювали за допомогою хроматографічних методів. Для колонкової хроматографії використовували силікагель фірми Chemapol (Чехія) з розміром пор Л 40/160 (висота 40 см і діаметр 2,0 см) і розчинники: метанол, *n*-гексан, петролейний ефір ($t_{\text{кип}} = +40-65^\circ$), ацетон, етил-ацетат, хлороформ, ізопропанол, димексид (усі ці реактиви класу чда).

Наважку у 2,8 г густої темно-коричневої маси, одержаної екстракцією гексаном метанольного залишку, розчиняли в 12,0 мл *n*-гексану і наносили на колонку, яку було попередньо промито чистим *n*-гексаном. Після цього колонку промивали послідовно розчинниками: *n*-гексаном (200 мл), сумішами гексан-етилацетату 7,5 : 1 (300 мл) і гексан-етил-ацетат-метанолу 4 : 2 : 1 (300 мл), ізопропанолом (160 мл) і метанолом (200 мл), що забезпечувало повне очищення колонки від пігментних речовин. За результатами вимірювання абсорбції елюйованого розчину при λ 300 нм і 450 нм одержано 6 фракцій, які позначили 1.1–1.6 відповідно. Аналіз одержаних фракцій здійснювали за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках «Силуфол» і за допомогою ГРХ/МС. Показано, що одержані фракції не є індивідуальними речовинами, а складними сумішами речовин.

Хімічний склад фракцій 1.1–1.3 та 1.5–1.6 за допомогою ГРХ/МС був досліджений раніше [5]. У той самий час, фракція 1.4. виявилася дуже складною і її вдалося дослідити лише після додаткового розділення на

колонці (силікагель Л 40/160). Кращий результат розділення цієї фракції було одержано у разі застосування системи розчинників хлороформ – діоксан – метанол 12 : 1 : 2. Наважку фракції (0,43 г) розчиняли в системі розчинників і наносили на колонку силікагелю (висота 9 см, діаметр 1,6 см), збираючи фракції об'ємом 2,5 мл. Після зняття з колонки основної маси речовин, колонку промивали сумішшю хлороформ-діоксан-метанол 1 : 1 : 1. Під час цього процесу сформувалася ще одна чітка коричнева зона, яка виходила з колонки. Вихід речовин із колонки контролювали за абсорбцією елюату при 450 нм. За результатами вимірювання виділено 4 фракції, які було проаналізовано ГРХ/МС.

Ідентифікацію речовин у фракціях здійснювали за допомогою мас-спектрометра 6С/MS Agilent Technologies 6890 N/5975 В, приєднаного до хроматографічної колонки (модель HP-5МС, довжина 30 м, діаметр 0,25 мм, наповнювач: 95% диметилполісилоксан + 5% дифенілполісилоксан); газ-носії – гелій з постійним потоком 1,5 мл/хв). Колонку промивали метанолом.

Газова хроматографія була запрограмована на рівень зростання температури на 15 °С/хв від 75 до 300 °С. Початкова температура підтримувалася протягом 1 хв, а кінцева – протягом 8 хв. Використовували мас-селективний детектор із температурою інтерфейсу T = 250 °С. Іонізацію здійснювали електронним ударом, енергія іонізації – 70 еВ, температура іонного джерела 230 °С; температура квадруполя – 150 °С.

Результати та обговорення

Хімічний склад фракцій 1.1–1.6 (крім 1.4.) описано в нашій попередній роботі [6]. Фракцію 1.4 проаналізовано за допомогою ГРХ/МС після її розділення на колонці силікагелю Л 40/160, із застосуванням системи хлороформ – діоксан – метанол зі зміною співвідношення цих розчинників. Ключову роль у розділенні цієї фракції відіграло застосування 1,4-діоксану, який добре змішується як з полярними, так і неполярними розчинниками (гексаном, хлороформом, метанолом, водою). За результатами вимірювання виділено 4 фракції (рис. 1), які було позначено як 1.4.1–1.4.4 і які в подальшому аналізували за допомогою ГРХ/МС. Аналіз фракції 1.4.1 із застосуванням комп'ютерної бази даних мас-спектрометра виявив 51 речовину, у фракції 1.4.2 – 59 речовин, у фракції 1.4.3 – 33 речовини, а у фракції 1.4.4 – 6 речовин. Необхідно зазначити, що вміст більшості речовин у фракціях був нижчим за 1%, а ступінь вірогідності ідентифікації цих речовин був невисоким, що може пояснюватися недостатнім хроматографічним розділенням їх. Результати аналізу фракцій 1.4.1–1.4.4 представлено в таблиці, з якої видно, що фракція 1.4 в цілому характеризувалася підвищенням вмісту полярних сполук порівняно з попередніми фракціями (1.1–1.3). Вміст сесквітерпенів у ній нижче порівняно з фракцією 1.3, у той час як вміст фталатів – вище. Очевидно, ця фракція містить основну масу речовин, які обумовлюють емульсійну стійкість молочного соку базидієм *L. pergamenus*.

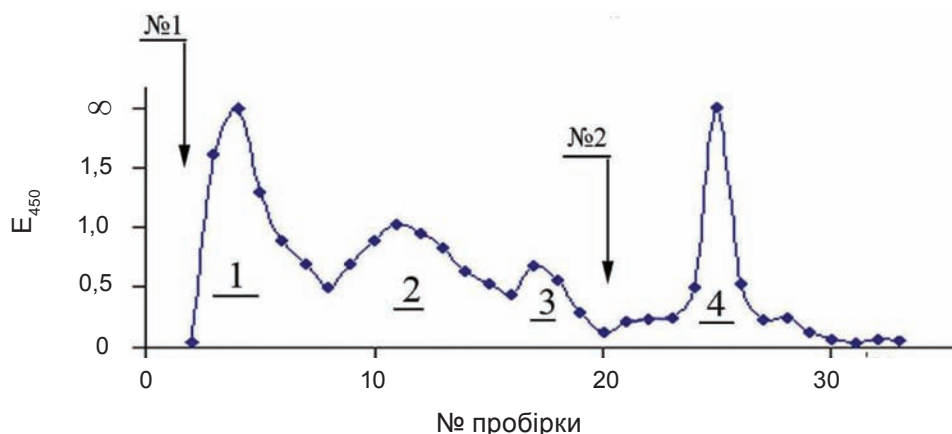


Рис. 1. Хроматографічне розділення фракції 1.4 на колонці силікагелю Л 40/160 ($h = 9$ см, $d = 1,6$ см, фракції об'ємом 2,5 мл, швидкість елюції – 0,5 мл/хв). №1 – місце внесення елюенту (хлороформ – діоксан – метанол 12 : 1 : 2); №2 – місце внесення елюенту (хлороформ – діоксан – метанол 1 : 1 : 1)

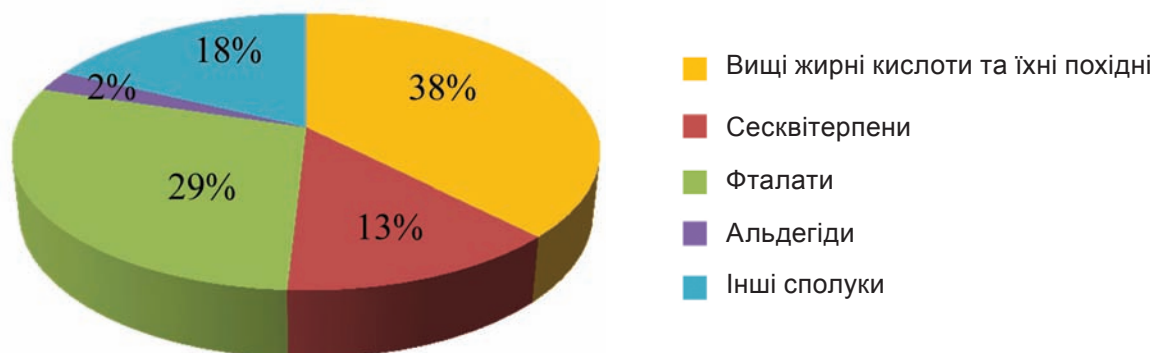


Рис. 2. Хімічний склад гексанової фракції метанольного екстракту *L. pergamenus* (за результатами попередньої роботи [5] і даними аналізу фракції 1.4)

Як було показано в попередній роботі [6], фракція 1.4. за дії на лейкозні клітини була другою за активністю серед фракцій 1.1–1.6 висушених базидієм *L. pergamenus*, а її маса становила $\approx 43\%$ маси гексанового екстракту. Цитотоксичний ефект цієї фракції може бути також пов'язаний із вмістом сесквітерпенових сполук, однак він є слабкішим через їх низький вміст у фракції (табл.). Сумарна гексанова фракція має виражену протигрибкову дію проти *Candida albicans*, яка була значно вищою за таку дію окремих фракцій [8], можливо, через потенціювання дії окремих речовин, які містяться, зокрема, і у фракції 1.4.

Отже, беручи до уваги експериментальні дані, наведені в цій роботі, а також результати роботи [6], нами охарактеризовано повний хімічний склад гексанової фракції метанольного екстракту висушених базидієм *L. pergamenus* (рис. 2). Встановлено, що екстрагування саме гексаном метанольного екстракту цих базидієм дозволяє одержати найбільшу кількість речовин з антипроліферативною і протигрибковою активністю. Хімічний склад гексанового екстракту є складним і містить такі основні групи речовин:

1. Вищі жирні кислоти та їхні похідні, насамперед, стеаринова і олеїнова кислоти, їх ефіри та амід.

2. Фталати (дибутилфталат, діізобутилфталат, ізооктилфталат, діізооктилфталат, біс(2-етилгексил) фталат).

3. Сесквітерпени (похідні азулену, лактарану, еудезману).

4. Альдегіди органічних кислот (листяковий і пеларгонієвий альдегіди, альдегіди стеаринової та олеїнової кислот).

5. Інші сполуки, серед яких є вуглеводні (1-гептадецен), спирти (2-етокси-1-пропанол), похідні гідразину (пропілгідразин, етилгідразин) та сполуки, вірогідність ідентифікації яких не була високою, які потребують додаткових досліджень.

Така сукупність речовин дозволяє створити стійку емульсію молочного соку, який захищає плодове тіло гриба від поїдання ссавцями, комахами, а також захищає його від бактеріальних і грибових інфекцій. У сукупності речовини кожної групи забезпечують виконання певних функцій. Якщо вищі жирні кислоти та їхні ефіри забезпечують емульгувальні властивості, а фталати виявляють репелентні, сесквітерпени – протигрибкову і антимікробну дію, то альдегіди обумовлюють пекучий смак соку для тварин і є основними антифідантами. Відомо, що молоді і наповнені молочним соком гриби *L. pergamenus* практично не бувають червивими і лише після втрати цього соку при старінні гриби починають пошкоджуватися мікроорганізмами та комахами.

Якісний і кількісний склад фракції 1.4, одержаної екстракцією гексаном метанольного екстракту ви-сушених базидієм *L. pergamenus*

№ фракції	Масова частка фракції, %	Хімічний склад одержаних фракцій (основні речовини, ідентифіковані за допомогою мас-спектрометрії та їх кількість)		
		Назва речовини	Масова частка у фракції, %	Ступінь вірогідності*, %
1	2	3	4	5
1.4.1	16,3	1. Етилформіат	8,01	59
		2. Етилгідазин	1,68	58
		3. 2-Етокси-1-пропанол	1,36	50
		4. 2-Ізопропіліден-5,9-диметил-4-ацетокси-1,2,3,4,5,6,7,8-октагідронафтален-1-он	1,62	86
		5. 1-Гідроксигуайя-3,10(14), 11(13)-трієн-6,12-олід	1,56	50
		6. 3,8- α -Фуранетер	4,73	83
		7. Пальмітинова кислота	3,18	99
		8. Дибутилфталат	4,50	95
		9. Азулено[6,5-b]фуран-2,5-діон, декагідро-4а,8-диметил-3-метилєн-, [3aR-(3a. α .,4a. β .,7a. α .,8. β .,9a. α .)] (конфертін)	2,84	70
		10. Еудезма-5,11(13)-дієн-8,12-олід (алантолактон)	1,69	64
		11. Олеїнова кислота	6,33	99
		12. Стеаринова кислота	14,81	99
		13. Стеаринова кислота	1,87	95
		14. S-(2-Аміноетиловий) естер тіосульфатної кислоти	1,40	83
		15. 7-Метокси-5-етокси-2,2-диметилхроманон	6,81	91
		16. Біс(2-етилгексил) фталат	1,80	86
		17. Цис-9-октадеценаль (альдегід олеїнової кислоти)	1,83	91
		18. Еруциламід	2,69	93
1.4.2	12,1	1. Етиленгліколь диформіат	1,38	83
		2. Метил метоксіацетат	9,77	80
		3. 1,3-Діоксолан	1,16	50
		4. 3-Оксо-7,8.альфа.Н-еудезма- 4,11-дієн-12,8-олід	1,21	59
		5. Ізокротінілід	15,46	90
		6. Дибутилфталат	3,03	95
		7. 3а,9b-Диметил-1,2,3а,4,5,9b-гексагідроциклопента[а]нафтален-3-он	2,11	78
		8. Олеїнова кислота	1,49	62
		9. Стеаринова кислота	3,97	99
		10. 4-[4-Гідрокси-5-метоксифеніл]-1,2,3,6-тетрагідропіридин	3,32	64
		11. Азулено[5,6-с]фуран-1(3Н)-он, 3а, 4,4а,5,6,7,7а,8-октагідро-4-гідрокси-6,6,8-триметил-, (3а. α .,4. α .,4а. α .,7а. α .,8. α)	5,32	96

Таблиця (продовження)

1	2	3	4	5
1.4.2	12,1	12. Лактарорурфін А	2,65	90
		13. Біс(2-етилгексил) фталат	1,01	87
		14. 9-Октадеценаль (альдегід олеїнової кислоти)	5,23	91
		15. 9-Октадеценамід (амід олеїнової кислоти)	1,32	97
1.4.3	6,8	1. Етиленгліколь диформіат	3,7	83
		2. Діоксан	3,25	87
		3. Пропілгідазин	25,20	59
		4. Етилгідазин	4,46	53
		5. 1,3-Діоксолан	3,85	50
		6. Дибутилфталат	4,75	95
		7. Стеаринова кислота	1,86	99
		8. Азулено[5,6-с]фуран-1(3Н)-он, 3а, 4,4а,5,6,7,7а,8-октагідро-4-гідрокси-6,6,8-триметил-, (3а.а.,4.а.,4а.а.,7а.а.,8.а)	1,32	86
		9. 3-Нітрофталева кислота	2,35	74
1.4.4	64,8	1. Дибутилфталат	0,90	95
		2. 1-Гептадецен	0,08	94
		3. Діізобутилфталат	9,79	83
		4. Ізооктилфталат	0,16	80
		5. Діізооктилфталат	88,8	91

Примітки: в таблицю не внесені речовини, вміст яких у фракціях є меншим за 1% , а ступінь достовірності ідентифікації є нижчим за 50%. *Ступінь достовірності при ідентифікації речовини визначено як процент співпадіння мас-спектрів еталонної речовини у комп'ютерній базі даних і речовини у фракції, що аналізувалась. Розрахунок здійснено за допомогою комп'ютерної програми мас-спектрометра.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ МЛЕЧНОГО СОКА ГРИБА *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr С ПОМОЩЬЮ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ/МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

М. В. Цивинская^{1,2}, Л. В. Панчак³,
Р. С. Стойка^{4,1}, В. А. Антонюк^{4,3*}

¹Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;

²Научно-исследовательский экспертно-
криминалистический центр при ГУМВД
Украины во Львовской области, Украина;

³Львовский национальный медицинский
университет имени Данила Галицкого, Украина;

⁴Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: antonyukvo@gmail.com

Предложен метод разделения метанольного экстракта базидиом *Lactarius pergamenus* и исследования фракции, экстрагированной гексаном, которая согласно результатам пре-

дыдущих исследований обнаруживает наивысшую антипролиферативную и противогрибковую активность. Основное внимание уделено фракционированию и анализу методом газожидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ГЖХ/МС) экстрагированной гексаном фракции 1.4. Ключевую роль в разделении этой фракции сыграло применение диоксана, который хорошо смешивается как с полярными, так и неполярными растворителями (гексаном, хлороформом, метанолом, водой). Сделан вывод о полном химическом составе гексановой фракции метанольного экстракта высушенных базидиом *Lactarius pergamenus*. Показано, что эта фракция на 38% состоит из высших жирных кислот и их производных, на 29% – из фталатов, на 13% – из сесквитерпенов, на 2% – из альдегидов и на 18% – из других соединений (углеводороды, спирты, производные гидразина и неидентифицированные соединения). Такая совокупность веществ позволяет образовать стойкую

эмульсию млечного сока, который защищает плодовое тело гриба от бактериальных и грибковых инфекций и от поедания млекопитающими и насекомыми.

Ключевые слова: базидиомы гриба *Lactarius pergamenus*, экстракция метанолом, гексановый экстракт, хроматография на силикагеле, газожидкостная хроматография/масс-спектрометрия.

IDENTIFICATION OF COMPONENTS OF THE MILKY JUICE OF *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr FUNGI BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

M. V. Tsivinska^{1,2}, L. V. Panchak³,
R. S. Stoika^{4,1}, V. O. Antonyuk^{4,3*}

¹Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;

²Scientific-Research Center of Criminalistic Examination in Lviv Region, Ministry of Internal Affairs of Ukraine;

³Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Ukraine;

⁴Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: antonyukvo@gmail.com

The authors have proposed method of separation of methanol extract of *Lactarius pergamenus* basidiomes and investigation of fractions extracted with hexane which, according to our previous studies, possess the highest antiproliferative and antifungal activity. Main attention was given to fractionation and analysis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GLC/MS) of the fraction 1.4 extracted with hexane. The key role in separation of this fraction was played by the use of dioxane which mixes well with both polar and nonpolar solvents (hexane, chloroform, methanol, water). Chemical composition of hexanoic fraction of methanol extract of dried basidomes *Lactarius pergamenus* fungi were completely characterized. It was found that this fraction consisted of 38% of fatty acids and their derivatives, 29% – of the phthalates, 13% – of the sesquiterpene, 2% – of

aldehydes and 18% – of other compounds (hydrocarbons, alcohols, hydrazine derivatives and unidentified substances). Such combination of constituents allows forming a stable emulsion of milky juice which protects the mushroom fruit body from the bacterial and fungal infections and from eating by the mammals and insects.

Key words: *Lactarius pergamenus* fungi basidiomes, methanol extraction, hexanoic extract, chromatography on silica gel, gas-liquid chromatography/mass spectrometry.

1. Kramer R. Abraham W.-R. // Phytochem. Rev. – 2012. – **11**, N 1. – P. 15–37.
2. Velhsek J., Cejpek K. // Czech J. Food Sci. – 2011. – **29**, N 2. – P. 87–102.
3. Zhou Z.-Y., Liu J.-K. // [Электронный ресурс] Natural Product Reports, 2010, Режим доступа: <http://pubs.rsc.org>.
4. Jonassohn M. Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes. Structural properties that affect reactivity and bioactivity. Doctoral Thesis. Lund University (Sweden): Lund, 1996. – 83 p.
5. Hansson T., Pang Z., Sterner O. // Acta Chemia Scandinavica. – 1993. – **47**. – P. 403–405.
6. Панчак Л. В., Ключівська О. Ю., Цивінська М. В. та ін. // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 1 – С. 78–85.
7. Панчак Л. В., Цивінська М. В., Антонюк В. О., Стойка Р. С. // Біотехнологія. – 2011. – **4**, № 5 – С. 90–96.
8. Пат. 54969, Україна, МПК А61К9/06, А61К35/84 / Зайченко О. І., Панчак Л. В., Антонюк В. О. та ін.; заявник і патентовласник О. І. Зайченко, Л. В. Панчак, В. О. Антонюк, О. О. Немченко, С. Б. Гошкіна, М. В. Цивінська, Р. С. Стойка, О. П. Корнійчук, В. В. Данилейченко. – № и 2010 08043; заявл. 29.06.2010 ; опубл. 25.11.2010. Бюл. № 22.
9. Панчак Л. В., Антонюк В. А. // Биохимия (Москва). – 2011. – **76**, № 4. – С. 537–550.

Отримано 25.04.2013