

На правах рукописи



**ПРОЗОРОВА ИЛЮЗА ШАМИЛЕВНА**

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
*DAEDALEOPSIS TRICOLOR* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Казань – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

**Научный руководитель:** доктор химических наук, профессор,  
**Сысоева Мария Александровна**

**Официальные оппоненты:** **Минаков Денис Викторович**, доктор технических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет», профессор кафедры органической химии;

**Дышлок Любовь Сергеевна**, доктор технических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», заведующий лабораторией микробиологии и биотехнологий

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита состоится «10» декабря 2025 г. в 14.00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.028.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68, Зал заседаний Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте: [https://www.kstu.ru/event.jsp?id=171355&id\\_cat=141&idparent=0](https://www.kstu.ru/event.jsp?id=171355&id_cat=141&idparent=0)

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» октября 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
99.2.028.02



Хабибрахманова  
Венера Равилевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Грибы традиционно используются в культуре питания и медицине стран Восточной Азии благодаря накоплению ими биологически активных соединений с антиоксидантными, противомикробными, противоопухолевыми, пребиотическими, гипогликемическими и противовоспалительными свойствами. В настоящее время базидиомицеты широко применяют не только в пищевой и фармацевтической, но и других отраслях промышленности. Современной тенденцией биотехнологий является введение в культуру грибов с дальнейшей разработкой на их основе биологически активных добавок и лекарственных препаратов различного спектра действия. Рынок биологически активных добавок из класса парафармацевтиков на основе мицелия и метаболитов базидиомицетов увеличивается с каждым годом. В зависимости от рода и вида, грибы способны синтезировать различные метаболиты, в том числе антиоксиданты, такие как фенольные соединения, пигменты, отличающиеся по биологически активным свойствам. Их можно использовать для лечения и профилактики болезни Альцгеймера, сердечно-сосудистых заболеваний, новообразований. В связи с этим актуальным и перспективным является поиск новых конкурентоспособных штаммов базидиальных грибов, которые способны расти на дешевых питательных средах, продуцировать большее количество биомассы и метаболитов с высокой антиоксидантной активностью для их практического использования.

**Степень разработанности темы исследования.** Биотехнологи всего мира активно вводят в культуру штаммы дереворазрушающих грибов, чтобы найти суперпродуцент по накоплению биомассы и биоактивных соединений. Большой вклад в изучение грибов внесли биологи Бухало А.С., Бондарцев А.С., Бисько Н.А., Билай В.И., Гарибова Л.В., Теплякова Т.В., Псурцева Н.В. и другие. Во многих научных центрах и вузах Российской Федерации имеются большие коллекции культур высших грибов. Например, в Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов коллекция культур грибов (макро- и микромицетов) насчитывает свыше 720, а в Ботаническом институте им. В. Л. Комарова Российской академии наук – их более 830. В нашей стране в промышленном масштабе чаще используют микромицеты. Проводятся исследования по разработке и внедрению биотехнологий получения биомассы и метаболитов с использованием макромицетов. Биляловой А.С. разработана технология БАД «Летилсульфурин» на основе глубинного мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* ЗХ. Биотехнологии по получению экстрактов и мицелия при глубинном или поверхностном культивировании базидиомицета *Daedaleopsis tricolor* были разработаны Проценко М.А. Технология производства пищевой добавки на основе биомассы *Trametes pubescens* разработана Горшиной Е.С. Одним из крупных производителей пищевых и биологически активных добавок, а также косметических средств, содержащих экзо- и эндометаболизмы высших грибов (макромицетов) является компания ООО «Артлайф». В их коллекцию входят 13 видов грибов, среди которых ежевик гребенчатый (*Hericium erinaceus*), пило-

листник тигровый (*Lentinus tigrinus*), трутовик жестковолосистый (*Trametes hirsuta*) и другие.

**Цель работы** – обосновать выбор продуцента антиоксидантов из введенных в культуру новых штаммов грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10 и разработать биотехнологию получения его биомассы и экзометаболитов для создания в дальнейшем биологически активных добавок на их основе.

**Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:**

- 1) ввести в культуру новые штаммы базидиальных грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10, а также сравнить их ростовые характеристики на плотных средах;
- 2) получить биокомпозит похожий на картон, используя твердофазное культивирование *T. abietinum* KS10;
- 3) провести подбор питательных сред для погруженного жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10;
- 4) определить количество и антиоксидантные свойства эндометаболитов – пигментов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, а также провести их отнесение к меланинам;
- 5) определить количество и антиоксидантные свойства экзометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, а также содержание в них простых фенолов;
- 6) обосновать выбор *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо-, эндометаболитов;
- 7) провести оптимизацию состава питательной среды для погруженного жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11 с применением программы *Statistica 13*, чтобы увеличить выход биомассы и повысить антиоксидантные свойства экзометаболитов;
- 8) разработать блок-схему, технологическую схему, рассчитать материальный баланс и технико-экономические показатели культивирования гриба *D. tricolor* KS11 и сформировать нормы качества получаемых продуктов.

#### **Научная новизна работы.**

Введены в культуру и депонированы в базу данных GenBank новые штаммы грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10.

Впервые показано, что *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 можно отнести к быстро растущим, поскольку они способны накопить биомассы до 125 мг и 205 мг за 9 и 6 суток соответственно, при выращивании на плотной среде, содержащей глюкозу и дрожжевой экстракт, при температуре 27 °С, что в 1,8 и 2,9 раз больше и на 7 и 10 дней быстрее, по сравнению с *P. fulgens* KS12.

Выявлена перспектива твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10 на лузге подсолнечника с добавкой 1 % овсяных отрубей с получением биокомпозитов для изготовления упаковочных материалов.

Описаны особенности роста, морфология мицелия, а также формирование колоний и пеллет *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при их погруженном культивировании и на плотных средах.

При погруженном культивировании *D. tricolor* KS11 на 4 сутки на среде с дрожжевым экстрактом и соевым изолятом (1:1) культура накапливает биомассу на 14 % и 26 % больше, по сравнению с *T. abietinum* KS10 на 3 сутки на питательной среде с дрожжевым экстрактом, и *P. fulgens* KS12 на 15 сутки на среде с соевым изолятом.

Экзометаболиты *D. tricolor* KS11, по сравнению с экзометаболитами *T. abietinum* KS10 содержат в 2,9 раза больше простых фенолов, и их антирадикальная активность (IC<sub>50</sub>, ДФПГ) в 2,4 раза выше.

Эндопигменты *D. tricolor* KS11 обладают антирадикальной активностью (IC<sub>50</sub>, ДФПГ), превышающей в 3,5 раза аналогичную активность эндопигментов, выделенных из пищевых добавок, содержащих мицелий грибов *Cordyceps* (ООО «Компания Хорст») и *Trametes versicolor* (NS Organic).

Экспериментально доказан выбор *D. tricolor* KS11 для разработки биотехнологии получения биомассы и экзометаболитов с целью создания на их основе пищевых и биологически активных добавок антиоксидантного действия.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Обобщены данные, приведенные в научной литературе, по культивированию, получению биомассы и метаболитов, а также по составу биологически активных веществ, накапливаемых *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, и разработке биопродуктов на основе бизидиомицетов.

Проведенная оптимизация состава среды для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 позволяет получить экзометаболиты с антирадикальными свойствами в 10 раз более высокими по сравнению с исходными.

При масштабировании процесса погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 на средах разного состава в колбах объемом на 0,75 л, 1 л и 2 л получены одинаковые результаты по количеству биомассы.

Разработана биотехнология культивирования гриба *D. tricolor* KS11 с годовой производительностью 434,7 кг биомассы и 170,1 кг экзометаболитов. Сформированы нормы качества на биомассу и экзометаболиты *D. tricolor* KS11.

Биомасса *D. tricolor* KS11 может быть использована для создания пищевых и биологически активных добавок, поскольку она безопасна (ЛД<sub>50</sub>>8000 мг/кг) и отнесена к 4-му классу токсичности.

Разработан способ получения биокомпозита, который может быть применен для создания упаковочных материалов, путем проведения твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10.

Основные результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО КНИТУ при подготовке магистров, обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология» (акт от 16.06.2025 г.).

Разработаны технические условия на добавки биологически активные к пище на основе биомассы и экзометаболитов гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11 (акты от 10.06.2025 г.).

**Методология и методы исследования.** В диссертации применены общенаучные методы, в том числе теоретические и эмпирические. Выделение и идентификацию новых штаммов грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10, их культивирование, определение ростовых показателей, микро- и макроморфологических признаков, количества биомассы и эндопигментов меланинового типа проводили с использованием стандартных методов, применяемых в микробиологии, микологии и биотехнологии.

Количественное содержание БАВ, антиоксидантные свойства метаболитов исследуемых базидиомицетов определяли с использованием современных спектрофотометрических методов, ИК-спектрометрии, ВЭТСХ анализа с применением САМАГ. Для планирования эксперимента по оптимизации состава питательной среды, а также статистической обработки полученных результатов применяли программное обеспечение *Statistica 13*.

Оценку токсикологической безопасности биомассы *D. tricolor* KS11 осуществляли согласно руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.

**Положения, выносимые на защиту:**

- получение новых штаммов базидиальных грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10;
- проведение жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на питательных средах, содержащих разные источники азота;
- антиоксидантные свойства экзо- и эндометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10;
- обоснование выбора *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо-, эндометаболитов;
- оптимизацию состава питательной среды для погруженного жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11;
- разработку биотехнологии погруженного культивирования гриба *D. tricolor* KS11 и норм качества получаемых продуктов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обеспечена применением стандартных микробиологических и биотехнологических способов проведения исследований, современных физико-химических методов анализа. Статистический анализ полученных результатов проведен с помощью программного обеспечения *Statistica 13*, оснащенной набором инструментов для анализа данных.

Результаты экспериментальных данных были доложены и обсуждены на: IV Международном биотехнологическом форуме «BIOAsia-Altai 2024» (Барнаул, 2024 г.), XVIII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотех-

нологии» (Уфа, 2024 г.), Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития фундаментальной и прикладной микробиологии: точка зрения молодых ученых» (Ташкент, 2024), IX Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг» (Иркутск, 2025), XIX Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2025).

**Публикации.** Основные полученные результаты работы изложены в 8 работах, из них 1 статья в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, 2 статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science, 5 публикаций в сборниках Международных и Всероссийских научных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков, 38 таблиц, 183 литературных источника, в т.ч. 134 иностранных, 10 приложений.

**Личный вклад автора** состоит в: участии постановки целей и задач; в выполнении экспериментов, проведении расчетов, обобщении и апробации полученных результатов; формулировке выводов о проделанной работе; подготовке, написании и оформлении тезисов докладов, статей и диссертационной работы.

Автор выражает благодарность куратору доценту кафедры пищевой биотехнологии КНИТУ, к.х.н. Сыроевой Е.В. за помощь в проведении исследовательской работы, а также всем сотрудникам кафедры пищевой биотехнологии за консультации в проведении экспериментов. В ИОФХ им. А. Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН в лаборатории химико-биологических исследований под руководством д.б.н. Выштакалюк А. Б. исследована цитотоксичность образцов. В ФГАОУ ВО КФУ в научно-исследовательской лаборатории генетики микроорганизмов проведено секвенирование по методу Сэнгера под руководством к.б.н Григорьевой Т. В., а ИК-спектроскопия осуществлена в научно-исследовательской лаборатории медицинских материалов ФГАОУ ВО КФУ под руководством к.б.н. Абдуллина Т. И.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы поиска высокопродуктивных штаммов базидиальных грибов и разработки биотехнологии их культивирования для получения биомассы, метаболитов и создания, в дальнейшем, пищевых и биологически активных добавок. Определены объекты исследования, цель и задачи диссертационной работы, оценена степень научной новизны, теоретической и практической значимости работы, изложены методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов исследований, личный вклад автора.

**В первой главе** представлены обобщенные литературные данные по исследованию метаболитов высших грибов и их биологически активным свойствам. Рассмотрен потенциал базидиомицетов *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, их культивирование на плотных и жидких

средах, а также ростовые характеристики. Показаны современные направления создания биопродуктов на основе мицелиальной биомассы грибов, которые могут быть применены в различных сферах, например, в качестве лекарственных и косметических средств и др.

**Во второй главе** описаны материалы и методы, использованные в работе: выделение и идентификация чистых культур грибов; их культивирование на плотных, твердых и жидких средах; определение культурально-морфологических и ростовых характеристик; выделение экзо- и эндометаболитов; качественные реакции на меланины; определение сухих веществ, общей зольности, микробиологической чистоты; определение общего содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу, простых фенолов и флавоноидов; определение антиоксидантной активности фосфомолибденовым и фенантролиновым методом, а также антирадикальных свойств (ДФПГ); ИК-спектроскопия. Приведены питательные среды и их состав. Представлены используемые системы растворителей и проявители для анализа фенольных и липофильных соединений методом ВЭТСХ с применением автоматизированной системы САМАГ. Описаны планирование эксперимента и статистическая обработка полученных данных с помощью программы *Statistica 13*.

**Во третьей главе** представлены результаты введения в культуру новых штаммов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, их культивирование на плотных и твердых средах.

Выделение новых штаммов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. Они выделены из природных плодовых тел, собранных в смешанном лесу Республики Татарстан и Республики Марий Эл осенью 2019 и 2022 года. Они были идентифицированы на основе культуральных, в том числе, морфологических характеристик, а также с помощью секвенирования по Сэнгеру. Выделение новых штаммов грибов проводили традиционным методом согласно схеме, приведенной на рисунке 1. У выделенных чистых культур изучены макро- и микроморфология. С помощью программного пакета NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) установлено сходство сиквенса выделенных культур более чем на 99 % со штаммами *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*,

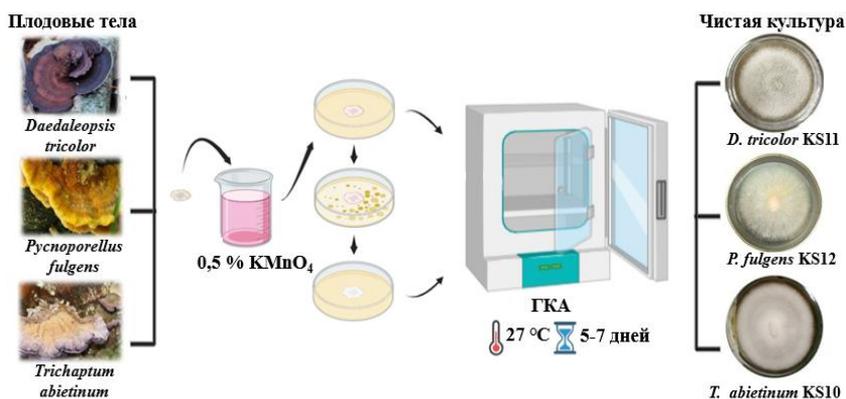


Рисунок 1 – Схема выделения новых штаммов грибов *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*

зарегистрированных в базе данных GenBank.

Культуры депонированы в базу данных GenBank Overview. Географические сведения, присвоенные регистрационные номера и штаммы грибов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Географические данные, время сбора природных плодовых тел грибов и присвоенные номера, полученных новых штаммов в GenBank

Гриб	Штамм	Год сбора	Место сбора	Депонирован, год	Номер GenBank
<i>D. tricolor</i>	KS11	2022	Республика Татарстан (55°57'17" с.ш. и 49°09'04" в.д.)	2023	OR804093
<i>P. fulgens</i>	KS12	2022	Республика Татарстан (55°57'17" с.ш. и 49°09'04" в.д.)	2023	OR805526
<i>T. abietinum</i>	KS10	2019	Республика Марий Эл (56°04'04" с.ш. и 48°20'11" в.д.)	2023	OR610852

Культивирование *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum* на плотных средах.

Для подбора оптимального источника углерода и азота для каждой культуры гриба, их выращивали на агаризованных (агар – 20 г/л) средах: Сабуро, Чапека, глюкозо-картофельной (г/л: картофель – 200; глюкоза – 20), глюкозо-пептонной (г/л: глюкоза – 30; пептон – 5; дигидроортофосфат калия – 1; магний сернокислый – 5), с дрожжевым экстрактом (г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний сернокислый – 0,5), а также с дрожжевым экстрактом и энтегнином (глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; энтегнин – 0,01; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний сернокислый – 0,5).

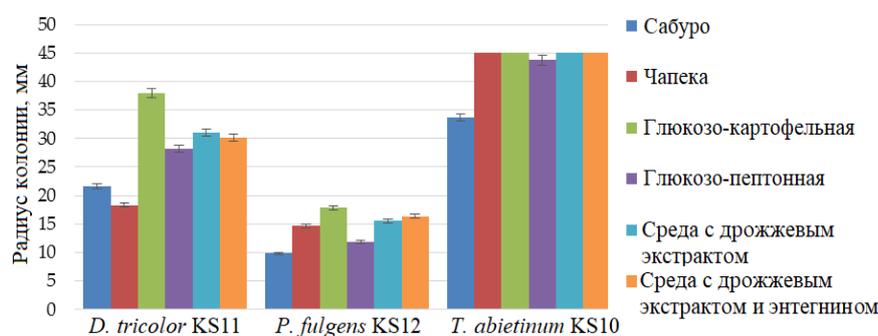


Рисунок 2 – Радиус 6-дневных колоний *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на плотных средах (n=5)

Рост культур на этих средах определен по скорости радиального роста (рисунок 2) и по накоплению биомассы (таблица 2). Как показано на рисунке 2, все базидиомицеты хорошо растут на глюкозо-картофельной среде. У гриба *T. abietinum* KS10 наблюдается наибольший радиальный рост к 6-му дню культивирования практически на всех агаровых средах, за исключением среды Сабуро.

Таблица 2 – Количество мицелия *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на плотных питательных средах на конец культивирования (сутки) при 27 °C (n=3)

Питательная среда	<i>D. tricolor</i> KS11				<i>P. fulgens</i> KS12				<i>T. abietinum</i> KS10			
	Сут	Количество мицелия		Сут	Количество мицелия		Сут	Количество мицелия				
		мг	мг/см <sup>2</sup>		мг	мг/см <sup>2</sup>		мг	мг/см <sup>2</sup>			
Сабуро	13	168,67±9,87	2,76±0,18	23	135,47±12,80	2,13±0,20	9	235,50±34,65	3,70±0,54			
Глюкозо-картофельная	9	85,00±9,17	1,34±0,14	12	30,00±0,00	0,47±0,00	6	127,67±23,35	2,01±0,37			
Глюкозо-пептонная	9	57,00±3,61	0,96±0,10	17	79,67±22,85	1,33±0,33	7	130,00±32,53	2,04±0,51			
С дрожжевым экстрактом	9	125,00±24,58	1,97±0,39	16	70,00±10,00	1,01±0,00	6	204,67±22,50	3,22±0,35			
С дрожжевым экстрактом и энтегнином	9	125,33±24,95	2,04±0,28	16	81,33±16,01	1,37±0,25	6	157,00±26,21	2,47±0,41			
Чапека	16	33,00±18,03	0,54±0,28	17	2,00±1,00	0,04±0,02	6	1,00±0,00	0,02±0,00			

По данным, приведенным в таблице 2, все три базидиомицета накапливают наибольшее количество биомассы на среде Сабура, *D. tricolor* KS11 на 13, *P. fulgens* KS12 на 23 и *T. abietinum* KS10 на 9 сутки соответственно, т.е. за более продолжительное время по сравнению с остальными средами. Это связано с высоким содержанием глюкозы в среде, что способствует формированию более плотного мицелия. Интенсивное накопление мицелия данных базидиомицетов наблюдается также на среде с дрожжевым экстрактом. На этой среде *T. abietinum* KS10 по сравнению с *D. tricolor* KS11 продуцирует биомассы в 1,4 раза больше за более короткое время. Для *P. fulgens* KS12 необходима среда с дрожжевым экстрактом и энтегнином. При этом увеличивается количество его биомассы на 16 %, по сравнению с его выращиванием на среде без энтегнина.

Подбор оптимальной температуры выращивания проведен в диапазоне,

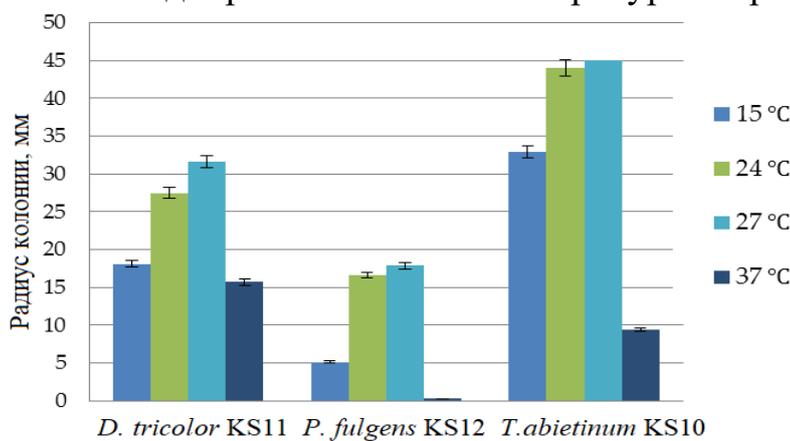


Рисунок 3 – Радиус 6-дневных колоний при культивировании *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 на среде с дрожжевым экстрактом, и *P. fulgens* KS12 с добавлением энтегнина при разных температурах (n=5)

указанном на рисунке 3. На нём представлен рост колоний исследуемых грибов на 6-е сутки культивирования. Оптимальной температурой выращивания для всех исследуемых культур является 27 °C, так как скорость роста к 6-ым суткам максимальна: 5,26 мм/сут у *D. tricolor* KS11, 2,98 мм/сут – *P. fulgens* KS12 и 7,5 мм/сут – *T. abietinum* KS10. Повышение температуры до 37 °C ингибирует рост культур.

Таблица 3 – Концентрация мицелия *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при разных температурах выращивания (n=3)

Температура, °C	<i>D. tricolor</i> KS11			<i>P. fulgens</i> KS12			<i>T. abietinum</i> KS10		
	Сут	Количество мицелия		Сут	Количество мицелия		Сут	Количество мицелия	
		мг	мг/см <sup>2</sup>		мг	мг/см <sup>2</sup>		мг	мг/см <sup>2</sup>
15	10	84,75±21,90	1,33±0,34	-	-	-	9	195,33±2,08	3,07±0,03
24	10	130,25±25,12	2,05±0,40	13	70,00±17,32	1,23±0,31	7	189,67±20,21	3,13±0,32
27	9	133,25±8,66	2,10±0,14	16	86,73±11,01	1,42±0,24	6	227,33±36,53	3,58±0,57
37	Ингибирует рост								

Примечание: - культура не растет

Данные по накоплению мицелия исследуемыми грибами, приведенные в таблице 3, подтверждают, что исследуемые грибы лучше растут при температуре 27 °C.

Согласно полученным результатам радиального роста и накопления биомассы при культивировании базидиомицетов на плотных средах при 27 °C, для *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 оптимальной является среда с дрожжевым экстрактом, а для *P. fulgens* KS12 – среда с дрожжевым экстрактом и энтегнином.

Твердофазное культивирование *T. abietinum* KS10 и получение биокомпози́та.

Культивирование *T. abietinum* KS10 проведено на трёх средах, содержащих шелуху подсолнечника с влажностью 75-80 %: 1) неизмельченная (размер частиц 4-13 мм); 2) измельченная (размер частиц 0,2-0,3 мм); 3) измельченная (размер частиц 0,2-0,3 мм) с добавлением 1 % овсяных отрубей.

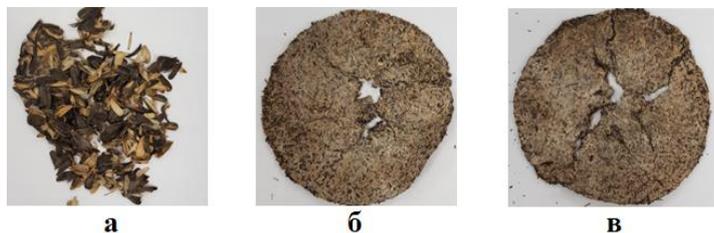


Рисунок 4 – Композиционные материалы, полученные при культивировании *T. abietinum* KS10 на шелухе семян подсолнечника: а) неизмельченной; б) измельченной; в) измельченной с добавлением 1 % овсяных отрубей

На 7-е сутки культивирования максимальный диаметр колонии 9,0 см достигается на неизмельченной шелухе семян подсолнечника при скорости роста гриба  $5,14 \pm 0,07$  мм/сут, а на измельченной шелухе семян подсолнечника, с добавлением овсяных отрубей –  $5,24 \pm 0,08$  мм/сут. Упаковочный композиционный материал сформирован прессованием с термообработкой при температуре 150 °С.

Как показано на рисунке 4, материал, полученный с использованием выросшего мицелия *T. abietinum* KS10 на неизмельченной шелухе, имеет рыхлую и ломкую структуру. Образцы биокомпозитов, полученных с культурой мицелия на измельченной лузге и на измельченной лузге с добавлением 1 % овсяных отрубей, имеют удовлетворительную структуру, похожую на картон. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания композиционных биоматериалов на основе мицелия *T. abietinum* KS10, выращенном на лузге семян подсолнечника.

**В четвертой главе** проведен подбор оптимального источника азотсодержащего субстрата для погруженного культивирования исследуемых культур базидиомицетов, обеспечивающий их интенсивный рост и максимальное накопление биомассы.

Погруженное культивирование. При исследовании роста исследуемых грибов на плотных средах было показано, что они быстро растут и накапливают биомассу на среде с дрожжевым экстрактом. Для интенсификации роста базидиомицетов часто применяют внесение в среду дополнительного источника органического азота, поэтому, при их погруженном культивировании использовали среды с содержанием дрожжевого экстракта и включали компоненты с соевым белком.

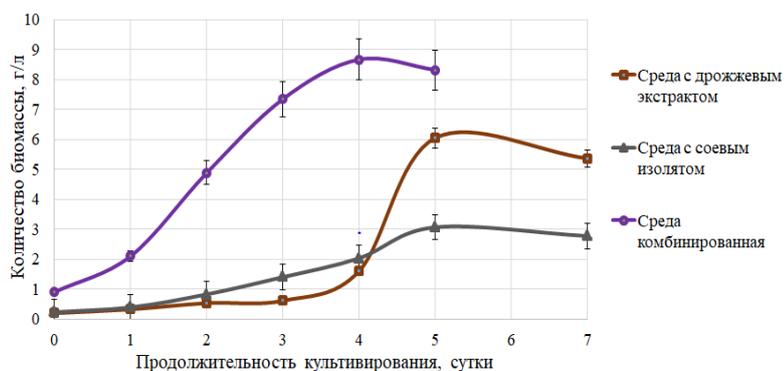


Рисунок 5 – Рост биомассы *D. tricolor* KS11 при культивировании на питательных средах с различными источниками азота

Внесение в среду дополнительного источника органического азота, поэтому, при их погруженном культивировании использовали среды с содержанием дрожжевого экстракта и включали компоненты с соевым белком.

Выращивание *D. tricolor* KS11 осуществлено на среде с дрожжевым экстрактом, с сое-

вым изолятом и комбинированной, которая содержит дрожжевой экстракт и соевый изолят в соотношении 1:1. Рост биомассы *D. tricolor* KS11 на этих средах представлен на рисунке 5. Согласно данным, приведенным на рисунке 5, внесение в среду с дрожжевым экстрактом соевого изолята позволило сократить процесс культивирования на 1 сутки и увеличить количество биомассы на 43 %.

Поскольку *P. fulgens* KS12 лучше рос на среде, содержащей дрожжевой экстракт и энтегнин, его культивирование было проведено на аналогичной среде.

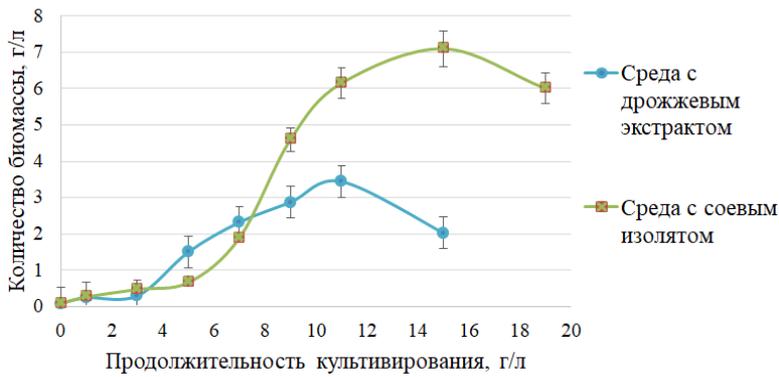


Рисунок 6 – Рост биомассы *P. fulgens* KS12 при культивировании на питательных средах с различными источниками азота

Для интенсификации роста *T. abietinum* KS10 были использованы среды с различным содержанием в них соевого белка. В качестве компонентов сред применены соевый изолят, с содержанием белка до 92 % и текстураты – с торговыми названиями «фарш» и «шницель», содержащих белка 46 %, углеводов 35 %, а также липидов 1,5 %.

Введение в среду соевого изолята с высоким содержанием белка замедлило рост гриба, а более низкое его содержание в средах с текстурами не позволило достичь того количества биомассы, которое наблюдалось при культивировании

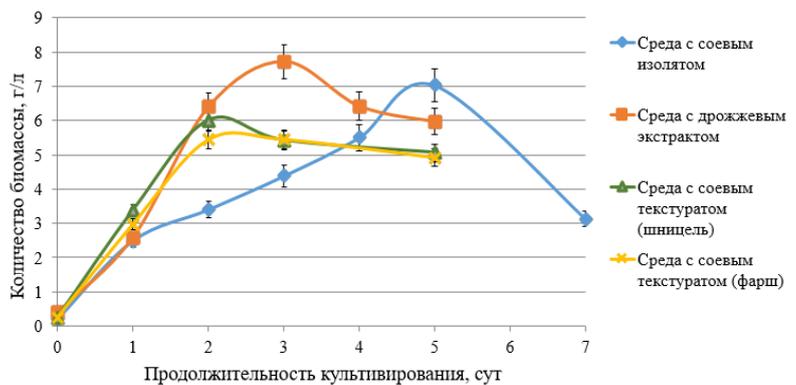


Рисунок 7 – Рост биомассы *T. abietinum* KS10 на средах, содержащих разные источники азота

*T. abietinum* KS10 на среде с дрожжевым экстрактом. Однако использование текстуратов позволяет сократить на сутки достижение максимума биомассы на этих средах, чем при его выращивании на среде с дрожжевым экстрактом.

На основании полученных результатов выявлено, что гриб *D. tricolor* KS11 является наиболее перспективным продуцентом биомассы, поскольку на комбинированной среде он за более короткое время, за 4 дня, накапливает её на 24 % и 12 % больше по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 соответственно.

На основании полученных результатов выявлено, что гриб *D. tricolor* KS11 является наиболее перспективным продуцентом биомассы, поскольку на комбинированной среде он за более короткое время, за 4 дня, накапливает её на 24 % и 12 % больше по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 соответственно.

Исследование экзометаболитов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. Для выявления перспективы использования суммарных экзометаболитов, накапливаемых исследуемыми базидиомицетами в культуральных средах, определены их антиоксидантная активность и содержание в них простых фенолов (таблица 4).

Таблица 4 – Содержание фенолов и антиоксидантная активность экзометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при погруженном культивировании на питательных средах, отличающихся по составу, источнику азота (n=3)

Гриб	Питательная среда	Сут	Содержание фенолов, мг/г	Антиоксидантная активность		
				Фосфолибденовый метод, мг/г	Фенантролиновый метод, мг/г	ДФПГ, мг/мл (IC <sub>50</sub> )
<i>D. tricolor</i> KS11	С дрожжевым экстрактом	1	0,80±0,10	27,67±0,90	2,18±0,34	7,61±0,20
		5	4,07±0,10	48,09±3,27	2,43±0,81	7,63±0,18
	С соевым изолятом	1	1,18±0,06	27,75±1,62	1,12±0,23	12,88±2,73
		5	0,74±0,19	49,30±4,34	2,22±0,23	4,56±0,34
	Комбинированная	1	0,39±0,01	33,26±1,90	2,08±0,13	13,09±1,89
		5	3,36±0,18	88,61±0,04	1,90±0,11	3,41±0,22
<i>P. fulgens</i> KS12	С дрожжевым экстрактом	11	1,25±0,15	124,83±1,02	2,28±0,08	5,82±0,67
		15	2,84±0,14	232,29±2,68	2,31±0,08	3,48±0,18
	С соевым изолятом	11	2,33±0,21	131,16±6,15	2,22±0,10	4,67±0,40
		15	3,01±0,56	156,65±3,20	3,06±0,17	2,38±0,11
<i>T. abietinum</i> KS10	С дрожжевым экстрактом	1	1,68±0,12	80,43±6,71	1,67±0,09	11,37±0,93
		3	1,17±0,05	52,25±3,83	1,65±0,28	8,06±0,65
	С соевым изолятом	1	1,80±0,22	39,95±3,34	0,59±0,13	9,54±0,72
		5	1,32±0,18	71,99±2,18	1,74±0,21	5,74±0,46

Согласно данным, приведенным в таблице 4, к 5 суткам выращивания *D. tricolor* KS11 на средах с дрожжевым экстрактом и комбинированной количество простых фенолов увеличивается в 5 и 8,6 раз соответственно, а на среде с соевым изолятом снижается в 1,6 раз. Соответственно, максимальные значения антиоксидантных (фосфолибденовый метод) и антирадикальных свойств (88,61 мг/г и 3,41 мг/мл) экзометаболитов, наблюдается при культивировании *D. tricolor* KS11 на комбинированной среде.

На конец культивирования *T. abietinum* KS10 на среде с соевым изолятом экзометаболиты обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью в 1,4 раза большей по сравнению с экзометаболитами, накапливаемыми этой культурой при выращивании на среде с дрожжевым экстрактом (таблица 4).

К 15 суткам выращивания *P. fulgens* KS12 на средах с дрожжевым экстрактом и соевым изолятом значимых отличий накопления в среде количества простых фенолов не обнаружено. Более высокие антиоксидантные свойства 232,29 мг/г показаны у экзометаболитов при культивировании гриба на среде с дрожжевым экстрактом, что в 1,5 раз больше по сравнению с экзометаболитами при использовании среды с соевым изолятом (таблица 4). А антирадикальные свойства экзометаболитов, наоборот, в 1,5 раза выше при культивировании

гриба на среде с соевым изолятом. К 15 суткам культивирования *P. fulgens* KS12 на среде с дрожжевым экстрактом пигменты придают культуральной жидкости оранжевую окраску, а пигменты, накапливающиеся в культуральной жидкости среды с соевым изолятом, окрашены в светло-коричневый цвет. Это свидетельствует о биосинтезе культурой экзопигментов, отличающихся по составу. Для более детального их изучения осуществлено разделение экзометаболитов экстракцией гексаном, хлороформом, этанолом, ацетоном и этилацетатом. Наилучшие результаты получены при применении этилацетата, поэтому их использовали для дальнейшего анализа. Для определения отличия состава фенольных и липофильных соединений в этилацетатных экстрактах применен метод ВЭТСХ. В обоих полученных этилацетатных экстрактах обнаружены фенольные соединения – дигидрокверцетин и гидрохинон, и липофильные – ланостерол. Выявлено, что экзометаболиты, полученные при выращивании гриба на соевом изоляте, содержат веществ фенольной природы на 3 соединения больше, а липофильных – на 1 соединение. Такое отличие согласуется с тем, что антирадикальная активность этилацетатных экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12, полученных при культивировании на среде с соевым изолятом, на 15 сутки на 42 % выше по сравнению с экстрактом экзометаболитов, полученных при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом.

С точки зрения дальнейшей разработки продуктов на основе экзометаболитов исследуемых грибов, они все представляют теоретический и практический интерес и, после более детального изучения, могут быть использованы для создания БАД.

Исследование эндометаболитов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. Для выявления перспектив использования биомассы исследуемых базидиомицетов были выделены и изучены эндометаболиты – пигменты меланиновой природы, которые обладают высокими антиоксидантными свойствами. Эндопигменты из биомассы базидиомицетов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 выделены по стандартным методикам получения меланинов, их количество и антиоксидантные свойства представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты определения концентрации эндопигментов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при погруженном культивировании на питательных средах, отличающихся по составу, источнику азота, а также их антиоксидантная активность (n=3)

Гриб	Питательная среда	Сут	Концентрация эндопигмента, мг/г*	Антиоксидантная активность, мг/г	
				Фосфомолибденовый метод	Фенантролиновый метод
<i>D. tricolor</i> KS11	С дрожжевым экстрактом	5	29,00±3,00	69,81±1,34	17,89±3,39
	С соевым изолятом	5	126,00±8,00	45,65±4,03	12,77±2,52
	Комбинированная	4	45,00±1,2	-	-
5		63,00±4,00	52,14±2,31	11,78±0,95	
<i>P. fulgens</i> KS12	С дрожжевым экстрактом	11	12,00±1,00	-	-
	С соевым изолятом	11	32,00±1,00	44,85±1,53	10,35±1,04
<i>T. abietinum</i> KS10	С дрожжевым экстрактом	4	72,00±5,00	63,38±1,02	5,76±1,27
	С соевым изолятом	5	30,00±4,00	82,71±4,24	21,28±3,48

Примечание: \*сухой биомассы

Установлено, что при выращивании *D. tricolor* KS11 и *P. fulgens* KS12 на питательной среде с соевым изолятом, грибы синтезируют большое количество эндопигментов, но с низкой антиоксидантной активностью. При выращивании *D. tricolor* KS11 на средах с дрожжевым экстрактом и комбинированной, количество синтезируемых ими эндопигментов снижается, при этом они имеют достаточно высокую антиоксидантную активность. Для *T. abietinum* KS10, при культивировании на этих средах, наблюдается обратная тенденция (таблица 5).

Грибы *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 синтезируют близкое количество пигментов, около 60-70 мг/г с антиоксидантными свойствами (фосфомолибденовый метод) 50-60 мг/г за более короткий срок по сравнению с *P. fulgens* KS12.

**В пятой главе** обоснован выбор культуры *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо- и эндометаболитов, а также проведена оптимизация состава питательной среды с помощью метода планирования эксперимента для его погруженного культивирования.

Обоснование выбора культуры *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо- и эндометаболитов.

Таблица 6 – Результаты погруженного культивирования грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 (n=3)

Показатели	<i>D. tricolor</i> KS11	<i>P. fulgens</i> KS12	<i>T. abietinum</i> KS10
Используемая среда	комбинированная	с соевым изолятом	с дрожжевым экстрактом
Продолжительность культивирования, дни	4	15	3
Количество биомассы, г/л	8,67±0,01	7,01±0,14	7,72±0,21
Количество эндопигментов, мг/г	63,00±4,00	32,00±1,00	72,00±5,00
Антиоксидантная активность эндопигментов, мг*/г:			
- фосфомолибденовый метод;	52,14±2,31	44,85±1,53	63,38±1,02
- фенантролиновый метод;	11,78±0,95	10,35±1,04	5,76±1,27
СВ культуральной жидкости, мг/мл	1,21±0,06	5,81±0,11	14,81±0,01
Содержание фенолов, мг/г	3,36±0,18	3,01±0,56	1,17±0,05
Антиоксидантная активность экзометаболитов:			
-фосфомолибденовый метод, мг*/г;	88,61±0,04	156,65±3,20	52,25±3,83
- фенантролиновый метод, мг*/г;	1,90±0,11	3,06±0,17	1,65±0,28
-ДФПГ, IC <sub>50</sub> , мг/мл	3,41±0,22	2,38±0,11	8,06±0,65

Примечание: \*эквивалент кверцетина

На основании полученных экспериментальных данных, суммированных в таблице 6, установлено, что для дальнейшей разработки биотехнологии перспективным продуцентом биомассы и экзометаболитов является *D. tricolor* KS11. При его выращивании на комбинированной среде он накапливает больше всего биомассы 8,67 г/л, его экзометаболиты содержат больше простых фенолов 3,36 мг/г и обладают наилучшими антирадикальными свойствами IC<sub>50</sub>=3,41 мг/мл, по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10.

Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11. Для осуществления оптимизации состава среды по углерод и азотсодержащим субстратам для погруженного культивирования

*D. tricolor* KS11 в качестве исходной была выбрана комбинированная среда. Применен метод планирования эксперимента, который осуществлен с использованием программы *Statistica 13*. В качестве варьируемых факторов  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  выбраны 3 компонента среды. Их концентрацию изменяли в указанных пределах:  $x_1$  – соевый изолят (от 2 до 3 г/л),  $x_2$  – дрожжевой экстракт (от 2 до 3 г/л),  $x_3$  – глюкоза (от 10 до 30 г/л). Выходными параметрами служили:  $y_1$  – антирадикальная активность экзометаболитов ДФПГ  $IC_{50}$ , мг/мл,  $y_2$  – количество биомассы, г/л.

Анализ полученных уравнений регрессии, диаграмм Парето позволили выявить, что лучше выбирать среду, при использовании которой накапливаются экзометаболиты с высокими антирадикальными свойствами. На основании

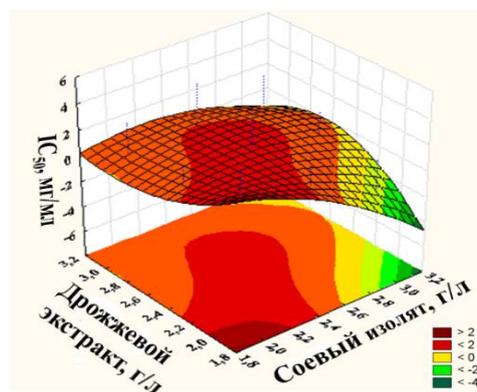


Рисунок 8 – График поверхности зависимости  $IC_{50}$  при значении параметра  $x_3$  (глюкоза) 10 г/л

построенного графика поверхности (рисунок 8) выбран следующий состав питательной среды для получения экзометаболитов с максимальными антирадикальными свойствами, г/л: соевый изолят – 3, дрожжевой экстракт – 2, глюкоза – 10.

Для подтверждения полученных результатов, представленных на рисунке 8, проведено культивирование *D. tricolor* KS11 на среде указанного выше состава. Получено, что антирадикальная активность (ДФПГ  $IC_{50}$ ) экзометаболитов составляет 0,62 мг/мл. При проведении оптимизации в эксперименте использована среда, близкая по составу, г/л: соевый изолят – 3; дрожжевой экстракт – 2,5; глюкоза – 10. Экзо-

метаболиты, полученные на этой среде, имеют антирадикальную активность в 1,4 раза более высокую (0,44 мг/мл), чем в вышеописанном эксперименте. Следует отметить, что оба значения антирадикальной активности экзометаболитов лежат в области оптимальных значений на рисунке 8. Поэтому эта среда с соотношением компонентов 3:2,5:10 выбрана как оптимальная. При культивировании на ней *D. tricolor* KS11 количество накапливаемой биомассы составляет 6,81 г/л. Поэтому её предлагается использовать для дальнейшей разработки биотехнологии получения продуктов на основе *D. tricolor* KS11.

Разрабатываемая биотехнология культивирования *D. tricolor* KS11 предполагает получение двух продуктов – экзометаболитов и биомассы. Для обоснования использования биомассы как источника антиоксидантов – пигментов, отнесенных к меланинам, проведено сравнение их антирадикальных свойств с аналогичными эндопигментами, выделенными из БАД (таблица 7).

Показано, что эндопигменты *D. tricolor* KS11 в 3,5 раза превосходят по антирадикальным свойствам эндопигменты, выделенные из пищевых добавок, содержащих мицелий *Cordyceps*. При этом требуется в 1,5 раза меньшее количество эндопигментов *D. tricolor* KS11, обеспечивающих более высокую антиоксидантную активность продукта, чем при применении эндопигментов *Cordyceps*.

Таблица 7 – Количество эндопигментов и их антирадикальная активность биомассы *D. tricolor* KS11 и пищевых добавок ООО «Компания Хорст» (*Cordyceps*), «NS Organic» (*Trametes*) (n=3)

Объект	Концентрация эндопигмента, мг/г	ДФПГ, IC <sub>50</sub> , мг/мл
Биомасса <i>Daedaleopsis tricolor</i> KS11	14,00±1,00	1,18±0,04
<i>Cordyceps</i> ООО «Компания Хорст», порошок	21,67±3,51	4,12±0,13
<i>Trametes versicolor</i> «NS Organic», капсулы (600 мг)	9,00±1,00	-

Полученные результаты показывают перспективу разработки конкурентоспособных БАД на основе как экзометаболитов, так и биомассы *D. tricolor* KS11.

Масштабирование процесса культивирования *D. tricolor* KS11. Для того, чтобы продолжить разработку биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11 в промышленном масштабе, оценить характер роста культуры и синтез биомассы при масштабировании процесса, проведено погруженное культивирование *D. tricolor* KS11 в лабораторных условиях в колбах разного объема.

Таблица 8 – Погруженное культивирование *D. tricolor* KS11 на средах различного состава в колбах разного объема (n=3-5)

Среда и ее состав, г/л	Объем колбы, л	Количество биомассы		
		г	г/л	г/л среднее
Синтетическая с соевым изолятом: соевый изолят – 5,0; глюкоза – 20,0	0,75	0,34±0,02	3,35±0,22	3,39±0,09
	1	0,70±0,07	3,50±0,36	
	2	1,33±0,23	3,33±0,57	
Комбинированная: соевый изолят – 2,5; дрожжевой экстракт – 2,5; глюкоза – 20,0	0,75	0,86±0,01	8,67±0,14	8,32±0,49
	1	1,71±0,12	8,54±0,62	
	2	3,10±0,16	7,76±0,41	
Оптимизированная: соевый изолят – 3,0; дрожжевой экстракт – 2,5; глюкоза – 10,0	0,75	0,68±0,06	6,81±0,66	7,34±0,47
	1	1,51±0,05	7,53±0,24	
	2	3,07±0,11	7,68±0,27	

Согласно данным, приведенным в таблице 8, культивирование гриба *D. tricolor* KS11 в колбах с разным объемом, культура накапливает близкое по количеству биомассы на различных средах. Изменений в образовании пеллет мицелия, свойств культуральной жидкости, при этом не наблюдалось.

**В шестой главе** составлена блок-схема, рассчитан материальный баланс и разработана биотехнология погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 для получения двух продуктов – биомассы и экзометаболитов.

Согласно рассчитанному материальному балансу при культивировании *D. tricolor* KS11 в ферментере объемом 1500 л за 1 производственный цикл можно получить 6,9 кг биомассы и 2,7 кг экзометаболитов.

На основании разработанной блок-схемы и подобранного оборудования составлена аппаратно-технологическая схема биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения продуктов, представленная на рисунке 9.

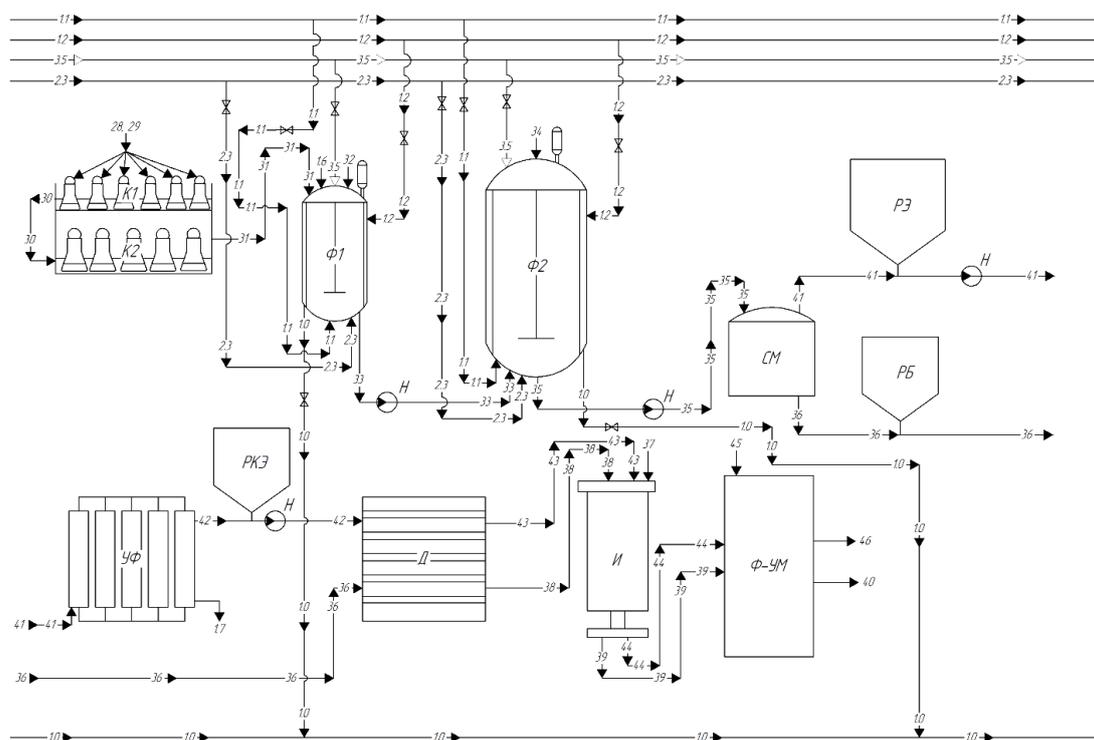


Рисунок 9 – Аппаратурно-технологическая схема биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов

Описание к аппаратурно-технологической схеме. Перечень оборудования: К1 – колба объемом 0,75 л; К2 – колба объемом 2л; Ф1 – ферментер объемом 150 л; Ф2 – ферментер объемом 1500 л; СМ – сепарационный модуль; РБ – резервуар для биомассы; РЭ – резервуар для экзометаболитов; РКЭ – резервуар для концентрата экзометаболитов; УФ – ультрафильтрационная установка; Д – дегидратор; И – измельчитель; Ф-УМ – фасовочно-упаковочная машина; Н – перистальтический насос.

Перечень технологических потоков: 1.0 – отработанная вода; 1.1 – питьевая вода; 1.2 – техническая вода; 1.6 – ледяная вода; 1.7 – пермеат; 2.3 – перегретый пар; 3.5 – сжатый воздух; 28 – стерильная комбинированная среда; 29 – инокулят; 30 – посевной материал 1; 31 – посевной материал 2; 32 – компоненты комбинированной среды; 33 – посевной материал 3; 34 – компоненты оптимизированной среды; 35 – биомасса с культуральной жидкостью; 36 – биомасса (влажность 95 %); 37 – стерильные пакеты; 38 – биомасса (влажность 12 %); 39 – измельченная биомасса; 40 – продукт – биомасса; 41 – экзометаболиты (влажность 99,7 %); 42 – концентрат экзометаболитов (влажность 80 %); 43 – экзометаболиты (влажность 10 %); 44 – измельченные экзометаболиты; 45 – упаковочный материал; 46 – продукт – экзометаболиты.

Характеристика продуктов, получаемых по разработанной биотехнологии погруженного культивирования *D. tricolor* KS11. Разработаны нормы качества на получаемые продукты – биомассу и экзометаболиты, которые представлены в таблице 9. Такие показатели как содержание эндопигментов и их антирадикальные свойства биомассы, а также содержание фенольных соединений и антирадикальные свойства экзометаболитов, позволят более точно рассчитать

суточную дозу для каждого продукта, повысить эффективность и безопасность их применения.

Таблица 9 – Требования, предъявляемые к биомассе и экзометаболизмам *D. tricolor* KS11

Показатели	Метод	Биомасса	Экзометаболизмы
Внешние признаки	-	Порошок светло-коричневого цвета со специфическим запахом	Порошок желтого цвета со специфическим запахом
Влажность, %	ГФ РФ XV	не более 12,0	не более 10,0
Зольность, %		не более 6,60±0,20	не более 34,06±0,03
Содержание фенольных соединений*, мг/г	Спектрофотометрия	-	не менее 6,09±0,19
Содержание флавоноидов**, мг/г		-	не менее 27,10±0,19
Содержание пигмента, мг/г	Гравиметрия	не менее 14,00±1,00	-
Антирадикальная активность, IC <sub>50</sub> , мг/мл	Спектрофотометрия	не более 1,18±0,04*	не более 0,44±0,07
Микробиологическая чистота	ТР ТС 021/2011	Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, КОЕ/г, не более 1×10 <sup>4</sup> ; Общее число дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г, не более 1×10 <sup>2</sup> ; Отсутствие <i>E.coli</i> , в 1 г продукта	

Примечание: \*в пересчете на галловую кислоту; \*\*в пересчете на дигидрокверцетин; \*\*\*эндопигмента

Токсикологическая безопасность биомассы *D. tricolor* KS11, получаемой при культивировании на оптимизированной питательной среде, проведена *in vivo* на белых самках мышей линии *ICR (CD-1)*. Показано, что исследуемые образцы биомассы имеют ЛД<sub>50</sub>>8000 мг/кг. По классификации Хабриева они были отнесены к 4-му классу токсичности (малотоксичные вещества).

Таблица 10 – Физико-химические свойства и микробиологические показатели биомассы и экзометаболизмов *D. tricolor* KS11 при его погруженном культивировании на оптимизированной питательной среде (4 сутки) (n=3)

Показатели	Биомасса	Экзометаболизмы
Количество, г/л	7,34±0,47	3,07±0,06
Зольность, %*	6,60±0,20	34,06±0,03
Влажность, %	7,01±0,22	9,28±0,41
Концентрация пигмента, мг/г	14,00±1,00	-
Антирадикальная активность, IC <sub>50</sub> , мг/мл	1,18±0,04**	0,44±0,07
Содержание фенольных соединений***, мг/г	-	6,09±0,19
Содержание флавоноидов****, мг/г	-	27,10±0,19
Микробиологические показатели (n=5)		
кМАФАнМ, КОЕ/г, не более	1,3×10 <sup>2</sup>	1,7×10 <sup>2</sup>
кДПМ, КОЕ/г, не более	не обнаружены	не обнаружены
<i>E. coli</i> , в 1 г	не обнаружены	не обнаружены

Примечание: \*от сухих веществ; \*\*эндопигмента; \*\*\*в пересчете на галловую кислоту; \*\*\*\*в пересчете на дигидрокверцетин

Согласно полученным результатам, представленным в таблице 10, биомасса и экзометаболические продукты гриба *D. tricolor* KS11 являются безопасными, отвечают микробиологическим показателям ТР ТС 021/2011, предъявляемым к БАД, и на их основе могут быть созданы пищевые и биологически активные добавки. Реализацию предлагаемой технологии можно осуществить на малых предприятиях пищевого профиля, дооснастив их соответствующим оборудованием. Преимуществом такого внедрения может быть то, что на этой линии можно будет производить БАД с применением различных продуцентов БАВ, что расширит спектр выпускаемых таким предприятием продуктов.

**В седьмой главе** представлено технико-экономическое обоснование разработанной биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11. Согласно произведенным расчетам, в год может быть осуществлено 63 производственных цикла, при этом годовая производительность биомассы составит 434,7 кг и экзометаболических продуктов 170,1 кг. Полученные продукты можно использовать как в качестве индивидуальных добавок, так и в комплексе с многокомпонентными пищевыми и биологически активными добавками, вносить в косметические средства. Рассчитана стоимость упаковки экзометаболических продуктов на 1 месяц приема, которая составит 3094 руб., и биомассы – 3957 руб., что находится на уровне с другими пищевыми добавками и БАД, аналогичного действия, и показывает перспективу производства БАД на основе биомассы и экзометаболических продуктов *D. tricolor* KS11. Рассчитанные технико-экономические показатели подтверждают экономическую целесообразность получения антиоксидантов на основе *D. tricolor* KS11.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) Выделены, идентифицированы и депонированы в базу данных GenBank новые штаммы грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10.

2) Установлено, что максимальный рост при культивировании на агаризованных средах грибов *T. abietinum* KS10 на 6 сутки и *D. tricolor* KS11 на 9 сутки, наблюдается на среде, содержащей дрожжевой экстракт, с накоплением биомассы 227,33 мг и 133,25 мг соответственно, а *P. fulgens* KS12 на 16 сутки – на среде, содержащий дрожжевой экстракт и энтегнин, с биомассой 86,73 мг. Оптимальная температура для всех исследуемых культур составляет 27 °С.

3) Разработан способ получения биокомпозита путем твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10 на измельченной шелухе семян подсолнечника с добавлением 1 % овсяных отрубей.

4) Определено, что максимальное накопление биомассы при погруженном культивировании наблюдается: у *T. abietinum* KS10 на 3 сутки на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, и составляет 7,7 г/л; *D. tricolor* KS11 на 4 сутки на комбинированной среде (дрожжевой экстракт:соевый изолят 1:1) – 8,7 г/л; *P. fulgens* KS12 на 15 сутки на среде с соевым изолятом – 7,0 г/л.

5) Показано, что при культивировании грибов *T. abietinum* KS10 на 3 сутки (среда с дрожжевым экстрактом), *D. tricolor* KS11 на 5 сутки (комбинированная среда – дрожжевой экстракт:соевый изолят 1:1) и *P. fulgens* KS12 на 15 сутки (среда с соевым изолятом) в культуральной жидкости накапливаются

вещества фенольной природы в количестве 1,17 мг/г, 3,36 мг/г и 3,01 мг/г соответственно. При этом антирадикальная активность (ДФПГ)  $IC_{50}$  суммарных экзометаболитов составляет у *T. abietinum* KS10 – 8,06 мг/мл, *D. tricolor* KS11 – 3,41 мг/мл, *P. fulgens* KS12 – 2,38 мг/мл.

б) Определено, что при культивировании грибов *T. abietinum* KS10 на 4 сутки (среда с дрожжевым экстрактом), *D. tricolor* KS11 на 5 сутки (комбинированная среда – дрожжевой экстракт:соевый изолят 1:1) и *P. fulgens* KS12 на 11 сутки (среда с соевым изолятом) в биомассе накапливаются пигменты меланинового типа в количестве 72 мг/г, 63 мг/г и 32 мг/г соответственно. При этом антиоксидантные свойства (фосфомолибденовый метод) эндопигментов составляют у *T. abietinum* KS10 – 63,38 мг/г, *D. tricolor* KS11 – 52,14 мг/г, *P. fulgens* KS12 – 44,85 мг/г.

7) Для разработки биотехнологии получения антиоксидантов – биомассы и экзометаболитов, и создания в дальнейшем биологически активных добавок на их основе, из трех исследованных штаммов выбрана культура *D. tricolor* KS11 на основании: короткого времени проведения процесса культивирования – 4 суток, накопления большого количества биомассы – 8,67 г/л и эндопигментов с высокими антиоксидантными свойствами (фосфомолибденовый метод) – 52,14 мг/г, а также экзометаболитов с максимальными антирадикальными свойствами – (ДФПГ)  $IC_{50}=3,41$  мг/мл.

8) С помощью оптимизации состава среды для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 показано, что антирадикальную активность (ДФПГ) экзометаболитов этого гриба можно увеличить в 10 раз по сравнению с исходной.

9) Разработана биотехнология погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 для получения двух продуктов – биомассы и экзометаболитов, а также сформированы их нормы качества. Показано, что годовая производительность продуктов на основе биомассы будет составлять 434,7 кг, а на основе экзометаболитов – 170,1 кг за 63 цикла.

Разработанная в диссертационной работе биотехнология культивирования гриба *D. tricolor* KS11 может считаться стартовой для дальнейшего создания биотехнологий получения биомассы и экзометаболитов, таких как фенольные соединения, меланины,  $\beta$ -глюканы и др. На основе этих продуктов могут быть созданы эффективные БАД и лекарственные препараты, обладающие высокой антиоксидантной, иммуномодулирующей, противовирусной, антиканцерогенной активностью. В целом, эти БАД могут решить проблемы импортозамещения и оздоровления населения Российской Федерации.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях  
Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах,  
входящих в перечень ВАК Минобрнауки России:**

1. Сысоева Е.В. Метаболиты, синтезируемые *Puccinoporellus fulgens* KS12 при погруженном культивировании / Е.В. Сысоева, **И.Ш. Прозорова**, М.А. Сысоева, Ю.С. Парикова // Бутлеровские сообщения. – 2024. – Т.80. № 12. – С. 175-184. (ВАК, K2).

**Статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования:**

2. Sysoeva M.A. Study of the process of solid-phase cultivation of higher fungi on milled sunflower seeds hulls for the obtaining of composite materials / М.А. Sysoeva, **I.Sh. Prozorova**, E.V. Sysoeva // Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya. – 2024. – № 3. – P. 313-319. (Scopus, Q4).

3. Sysoeva M. A. Characterization and biotechnology of three new strains of basidial fungi as promising sources of biologically active substances / М.А. Sysoeva, **I.Sh. Prozorova**, E.V. Sysoeva, T.V. Grigoryeva, R.K. Ismagilova // BioTech. – 2025. – Vol. 14, № 2. – 13 p. (WoS; Scopus, Q2).

**Статьи в прочих изданиях:**

4. **Прозорова И.Ш.** Антиоксидантная активность культуральной жидкости *Daedaleopsis tricolor* KS11, содержание в ней флавоноидов, простых фенолов / И.Ш. Прозорова, М.А. Сысоева, Е.В. Сысоева, Р.О. Красильников // Материалы IV Международного биотехнологического форума «BIOAsia-Altai 2024». – Барнаул, 2024. – С. 169-172.

5. **Прозорова И. Ш.** Биотехнология твердофазного культивирования гриба *Trichaptum abietinum* / И.Ш. Прозорова, М.А. Сысоева, Е.В. Сысоева, В.Р. Хабибрахманова, Л.Н. Нифантьева, М.Н. Егорова, К.С. Печникова // Материалы XVIII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии». – Уфа, 2024. – С. 74-75.

6. **Прозорова И. Ш.** Проблемы идентификации высших грибов и выделение чистых культур для их использования в биотехнологиях / И.Ш. Прозорова, М.А. Сысоева, Е.В. Сысоева // Материалы международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития фундаментальной и прикладной микробиологии: точка зрения молодых ученых». – Ташкент, 2024. – С. 662-665.

7. **Прозорова И. Ш.** Выделение эндопигментов *Daedaleopsis tricolor* KS11 и их антирадикальные свойства / И.Ш. Прозорова, Т.С. Сагдиева, М.А. Сысоева // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг». – Иркутск, 2025. – С. 89-92.

8. **Прозорова И. Ш.** Эндопигменты грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11 и *Trichaptum abietinum* KS10 / И.Ш. Прозорова, К.С. Печникова, Е.В. Сысоева, М.А. Сысоева // Материалы XIX Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии». – Казань, 2025. – С. 440-445.