

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»

На правах рукописи



ПРОЗОРОВА ИЛЮЗА ШАМИЛЕВНА

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

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Сысоева М.А.

Казань – 2025

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АБТС – 2,20-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)
- АФА – активные формы азота
- АФК – активные формы кислорода
- БАВ – биологически активное вещество
- БАД – биологически активная добавка
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
- ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилингидразил
- ИК – инфракрасная спектроскопия
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- КМАФАНМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов
- КДПМ – количество дрожжевых и плесневых грибов
- ЛД₅₀ – доза вещества, при которой погибает половина животных
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ССР – среднесуточная скорость роста
- США – Соединённые Штаты Америки
- ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза
- ЭПС – экзополисахарид
- ч. – чистый реактив, содержащий основное вещество более 98 %
- ч.д.а – чистый для анализа реактив, содержащий основное вещество 99 %
- х.ч. – химически чистый реактив, содержащий основное вещество 99,9 %
- о.с.ч. – особо чистый реактив, содержащий основное вещество более 99,9 %

IC₅₀ – концентрация, ингибирующая 50 % радикалов/вирусов

SPF – фактор защиты от солнца

Питательные среды:

ГКА – глюкозо-картофельная агаризованная – картофель, глюкоза, агар

ГПА – глюкозо-пептонная агаризованная – глюкоза, пептон, дигидро-ортофосфат калия, магний сернокислый, агар

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Лекарственные и биологически активные вещества грибов	17
1.2 Биотехнологический потенциал грибов рода <i>Daedaleopsis</i> , <i>Руснопореллус</i> и <i>Trichaptum</i>	22
1.3 Биопродукты на основе культивируемых базидиомицетов	29
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
2.1 Материалы, использованные в работе	34
2.2 Выделение чистых культур грибов	36
2.3 Культивирование <i>Daedaleopsis tricolor</i> KS11, <i>Руснопореллус fulgens</i> KS12, <i>Trichaptum abietinum</i> KS10 на плотных питательных средах	37
2.4 Твердофазное культивирование <i>T. abietinum</i> KS10	37
2.5 Погруженное культивирование грибов <i>D. tricolor</i> KS11, <i>P. fulgens</i> KS12 и <i>T. abietinum</i> KS10	38
2.6 Получение экстрактов экзометаболитов <i>P. fulgens</i> KS12	39
2.7 Масштабирование процесса погруженного культивирования <i>D. tricolor</i> KS11 на средах различного состава	39
2.8 Общие методы анализа	39
2.8.1 Секвенирование по методу Сэнгера	39
2.8.2 Микроскопирование	40
2.8.3 Определение радиальной скорости при культивировании на плотных питательных средах	40
2.8.4 Определение количества биомассы	40
2.8.5 Выделение эндопигментов	41
2.8.6 Качественные реакции на меланины	41
2.8.7 Определение сухих веществ	42
2.8.8 Определение общей зольности	42

2.8.9	Определение содержания простых фенолов	42
2.8.10	Определение содержания флавоноидов	42
2.8.11	Определение общего содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу	43
2.8.12	Определение общей антиоксидантной активности фосфомолибденовым методом	43
2.8.13	Определение антиоксидантной активности с помощью реактива 1,10-фенантролин	44
2.8.14	Определение антирадикальной активности	44
2.8.15	Определение скорости роста	45
2.8.16	Высокоэффективная тонкослойная хроматография	45
2.8.17	Проведение ИК-спектрометрии	46
2.8.18	Планирование эксперимента	46
2.8.19	Определение микробиологической чистоты	47
2.8.20	Статическая обработка полученных результатов	47
	ГЛАВА 3 ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ НОВЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ И ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПЛОТНЫХ И ТВЕРДЫХ СРЕДАХ	48
3.1	Выделение новых штаммов грибов <i>Daedaleopsis tricolor</i> , <i>Pycnoporellus fulgens</i> и <i>Trichaptum abietinum</i>	48
3.2	Подбор условий культивирования на плотных питательных средах базидиомицетов <i>D. tricolor</i> KS11, <i>P. fulgens</i> KS12 и <i>T. abietinum</i> KS10	53
3.3	Культивирование <i>T. abietinum</i> KS10 на твердых средах	60
	ГЛАВА 4 ПОГРУЖЕННОЕ ЖИДКОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>D. TRICOLOR</i> KS11, <i>P. FULGENS</i> KS12 И <i>T. ABIETINUM</i> KS10	63
4.1	Культивирование <i>Daedaleopsis tricolor</i> KS11	64
4.2	Культивирование <i>Pycnoporellus fulgens</i> KS12	66
4.3	Культивирование <i>Trichaptum abietinum</i> KS10	68
4.4	Метаболиты грибов <i>D. tricolor</i> KS11, <i>P. fulgens</i> KS12 и <i>T. abietinum</i> KS10	71

4.4.1	Физико-химические свойства суммарных экзометаболитов <i>D. tricolor</i> KS11, <i>P. fulgens</i> KS12 и <i>T. abietinum</i> KS10	71
4.4.2	Физико-химические свойства эндопигментов <i>D. tricolor</i> KS11, <i>P. fulgens</i> KS12 и <i>T. abietinum</i> KS10	77
	ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ПОГРУЖЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>D. TRICOLOR</i> KS11	81
5.1	Масштабирование процесса культивирования	87
	ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА <i>D. TRICOLOR</i> KS11	89
6.1	Блок-схема погруженного культивирования <i>D. tricolor</i> KS11	89
6.2	Аппаратурно-технологическая схема биотехнологии культивирования гриба <i>D. tricolor</i> KS11 для получения антиоксидантов	90
6.2.1	Подбор оборудования	90
6.2.2	Аппаратурно-технологическая схема	92
6.3	Расчет материального баланса получения продуктов – биомассы и экзометаболитов гриба <i>D. tricolor</i> KS11	94
6.4	Разработка норм качества на продукты, получаемые при культивировании базидиомицета <i>D. tricolor</i> KS11	100
	ГЛАВА 7 ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>D. TRICOLOR</i> KS11	102
7.1	График работы планируемого производства в год	102
7.2	Планирование капитальных затрат	103
7.3	Расчет стоимости сырья и основных материалов	104
7.4	Расчет количества и стоимости энергоресурсов	105
7.5	Расчет затрат на оплату труда персонала	106
7.6	Расчет сметы себестоимости готовой продукции	106
7.7	Расчет себестоимости единиц готовой продукции пищевых добавок и БАД на основе экзометаболитов и биомассы <i>D. tricolor</i> KS11	109

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	114
Приложения	134

ВВЕДЕНИЕ

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

микровицетов) 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 микровицеты. Проводятся исследования по разработке и внедрению биотехнологий получения биомассы и метаболитов с использованием макровицетов. 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 (макровицетов) является компания ООО «Артлайф». В их коллекцию входят 13 видов грибов, среди которых ежевик гребенчатый (*Hericium erinaceus*), пилолистник 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 экзометаболизмов 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 погруженно-го 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 (IC₅₀,ДФПГ) в 2,4 раза выше.

Эндопигменты *D. tricolor* KS11 обладают антирадикальной активностью (IC₅₀,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 объёмом 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 ($LD_{50} > 8000$ 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-спектromетрии, 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 биотехнологии» (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. Сысоевой 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-спектметрия осуществлена в научно-исследовательской лаборатории медицинских материалов ФГАОУ ВО КФУ под руководством к.б.н. Абдуллина Т. И.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С давних времен высшие грибы применяются не только в рационе питания человека, но и в народной восточной медицине Китая, Кореи, Тайланда и Японии. В последние десятилетия интерес ученых к базидиомицетам как продуцентам биологически активных веществ (БАВ) возрастает, поскольку публикуются большое количество статей, в которых демонстрируется их фармацевтический и терапевтический потенциал [1-7]. В зависимости от метаболизма культуры гриба, он будет продуцировать разные по составу и свойствам первичные и вторичные метаболиты. Разработка культивирования вновь вводимых штаммов высших грибов с получением новых метаболитов и большого количества мицелия является перспективным направлением создания биологически активных добавок (БАД). Наиболее известными базидиомицетами, широко представленными на рынке БАД, являются чага, кордицепс, рейши, шиитаке, траметес, ежовик гребенчатый. Лекарственным растительным сырьем для производства лекарственных препаратов согласно Государственной фармакопее Российской Федерации является березовый гриб чага или *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat (1942). *Inonotus obliquus* в процессе жизнедеятельности накапливает пигмент меланин, который проявляет высокие антиоксидантные свойства [8-11]. Экстракты склероция данного гриба оказывают антипролиферативное действие на меланому В16-F10 [12] и карциному легкого человека А549 [13]. Доказано, что экзополисахариды (ЭПС) *I. obliquus* проявляют гипогликемическую активность [14,15]. Инотодиол (один из ланостановых тритерпеноидов чаги) и полисахариды, полученные из культуры *I. obliquus* также проявляют противоопухолевую активность [8, 9].

Трутовик разноцветный или «индюшачий хвост» *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920) знаменит β-глюканом (крестин), который один из первых завершил фазу доклинических испытаний против рака молочной железы с доказанной эффективностью [16]. На сегодняшний день, крестин применяется, глав-

ным образом, в качестве вспомогательного средства в терапии рака, в том числе желудка, пищевода, легких, молочной железы [17-21].

Основными БАВ высших грибов являются антиоксиданты и полисахариды, в том числе β -глюканы. В связи с этим многочисленные исследования направлены на выделение активных метаболитов, а также изучение их свойств, состава и структуры. Клинически доказана противоопухолевая активность для некоторых коммерческих очищенных полисахаридов, например, лентинан из шиитаке – *Lentinula edodes*, крестин (полисахарид PSK и полисахаропептид) из *Trametes versicolor*, грифофан и грифрон-D из *Grifola frondosa* [22-24]. Исследования проведенные в Китае [25] показали, что применение лентинана в качестве вспомогательного терапевтического препарата при лечении пациентов с раком легких увеличивает частоту ответа на 13 % по сравнению с химиотерапией проводимой без его применения. Для пищевых добавок на основе грибов *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum* и *Coprinus comatus*, продаваемых в Сербии, авторами была доказана их антиоксидантная активность [26]. На рисунке 1.1 приведены некоторые грибы и их метаболиты, проявляющие противоопухолевую активность.



Рисунок 1.1 – Грибы и их метаболиты, проявляющие противоопухолевую активность

Особый интерес представляет разработка биотехнологий на основе новых штаммов базидиомицетов, как известных видов, так и малоизученных, в том числе *Daedaleopsis*, *Pycnoporellus*, *Trichaptum*, и др. Эти продуценты также могут стать источниками многих БАВ, таких как белки, полисахариды, фенольные соединения, стерины, терпены и др. Соответственно, перспективным направлением биотехнологии является выделение новых высокопродуктивных штаммов базидиомицетов, и разработка технологий получения на их основе БАД и лекарственных препаратов широкого спектра действия.

1.1 Лекарственные и биологически активные вещества грибов

Выраженными терапевтическими свойствами базидиомицетов обладают метаболиты, накапливаемые культурой гриба. Они отличаются по составу и различаются по проявлению биологической активности. Рассмотрим некоторые из них.

Полисахариды. При проведении скрининга 56 видов грибов, относящихся к различным таксономическим и экологическим группам, на предмет их способности продуцировать ЭПС было показано, что большинство исследованных штаммов грибов являются потенциальными продуцентами ЭПС. Наилучший выход ЭПС наблюдается у *Agaricus* sp. и *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Hohnel (1909), количество которых составляет 6,01 и 3,54 г/л на 7 день культивирования. *Tricholoma crassum* (Sacc.) Pegler & Lodge, (1998) имеет аналогичную продуктивность – 3,23 г/л, но на 14 сутки выращивания. Установлено, что выход ЭПС сильно различались в зависимости от вида базидиомицета [27].

Костиной Н. Е. и др. [28] были выделены различные БАВ более чем из 20 грибов Западной Сибири. Показано, что наибольшее содержание водорастворимых полисахаридов выделенных из природных грибов отмечается у *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarde (1972) – 373,2 мг/г, а спирто (этанол) растворимых из *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer (1941) – 451,3 мг/г.

В работе [29] выявлено, что содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler (1976) колеблется от 4,4 до 8,1 %, а

в шляпках и ножках культивируемых плодовых телах их количество составляло 7,5 и 8,9 % соответственно.

Количество экзополисахаридов у *S. commune* IBRC-M 30213 составляет 9,97 г/л, а *G. lucidum* и *L. edodes* от 1,6 до 1,8 г/л [30]. *Trametes ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvardeen, (1987) выделяет ЭПС от 0,72 до 1,20 г/л, проявляющие разные антирадикальные свойства по удалению радикаловДФПГ, в зависимости от источника углерода в составе питательной среды [31].

Белки. Основными химическими компонентами грибов являются белки и углеводы. Белки в их составе играют не только структурную функцию, но отвечают за такие виды биологической активности, как ферментативная, антибактериальная, фунгицидная, противовирусная, иммуномодулирующая и др. На содержание белка в грибах влияет ряд факторов, такие как вид гриба, стадия развития, часть плодового тела и количество доступного азота [32]. В исследовании [33] было определено содержание белка в пятнадцати базидиомицетах. Наибольшее количество белка 37,3 % и 33,5 % было обнаружено в плодовых телах *Agaricus brasiliensis* Fr., (1830) и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., (1871) соответственно, а также мицелии 42,5 % и 38,6 % у *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. и *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, (2007) соответственно. Наименьшее содержание белка было установлено в мицелии *T. versicolor* – 8,6 %, плодовых телах *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., (1881) – 9,20 % и *Tremella fuciformis* Berk., (1856) – 13,0 %.

В работе [34] определено содержание белка в водных экстрактах мицелия базидиомицетов *Fomes fomentarius* (L.) J. J. Kickx (1867) FA-3, *Fomitopsis pinicola* (Swartz: Fries) Karsten (1889) Fp-7, *T. versicolor* It-1, *T. biforme* Tb-4-1, *I. obliquus* Inon-1, *Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst. (1868) Cp-1. Его содержание варьировалось от 0,4 до 7,2 %. Наибольшее количество белка обнаружено в экстракте *T. versicolor* It-1, наименьшее – *F. fomentarius* FA-3.

Ферменты. Базидиомицеты секретируют такие ферменты как лакказа, лигнинпероксидаза, марганцевая пероксидаза и др. Показано, что *Funalia trogii* ТИ 035 (Berk.) Bondartsev & Singer при глубинном культивировании является

эффективным продуцентом термостабильной лакказы, с оксидазной активностью на 14 сутки 11,12 Ед/мл [35], а *F. pinicola* на 9 сутки выращивания синтезирует данный фермент с выходом после очистки 9 % и активностью 135,2 Ед/мг [36]. В работе [37] из культуральной жидкости *Fomitopsis palustris* BC315 (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvardeen, (1985) выделены ферменты – β-глюкозидазы (GI и GII) с выходом 8,8 % и 1,5 %, удельной активностью 836 и 157 Ед/мг соответственно.

Липофильные соединения. Биологическую активность многих видов высших грибов связывают с наличием в них терпеноидов. Такие тритерпеноидные соединения, как ганодеровые, люциденовые, астраловые кислоты и их многочисленные производные, обладают противовоспалительным, иммуномодулирующим, цитотоксическим действием [38]. В связи с этим выделению и идентификации веществ липофильной природы посвящено большое количество работ. Например, эритаденин (2(R), 3(R)-дигидрокси-4-(9-аденил)-масляная кислота) был впервые выделен из природного гриба *L. edodes* и идентифицирован как активный компонент, снижающий уровень холестерина. В этом базидиомицете эритаденин содержится в количестве 400-700 мг/кг сухого веса [39].

Двадцать тритерпеноидов, из которых четыре новые, были выделены из склероция *I. obliquus*. Некоторые соединения проявляли цитотоксичность в отношении линий опухолевых клеток A549, HT29, Hela и L1210 [40].

Моно- и сесквитерпены, а также алифатические спирты, альдегиды и т.д. особенно распространены в грибах. Так, сорок четыре соединения были обнаружены в плодовых телах *F. pinicola*, произрастающих в природе, из которых девять соединений относятся к алифатическим спиртам, кетонам и альдегидам; тридцать – терпенам; пять – ароматическим соединениям. Основную массовую долю (49,6 % от экстрактивных веществ) составляет 1-октен-3-ол [41], обладающий антибактериальной и фунгицидной активностью.

Десять новых сесквитерпеноидов типа хирсутана, стерхирсутины С–L, были выделены из культуры *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers., (1800). Стерхирсутины С–L показали цитотоксичность против линий клеток K562 и НСТ116. Стерхир-

сутин К индуцировал аутофагию в клетках HeLa, а стерхирсутин G ингибировал активацию промотора IFN β в клетках, инфицированных вирусом Сендай [42].

Фенольные соединения. В водных экстрактах мицелия шести лекарственных дереворазрушающих грибов, распространенных в лиственных и смешанных хвойных лесах Центральной России определено содержание фенолов, в % от сухих веществ: *F. fomentarius* FA-3 – 1,6 \pm 0,6; *F. pinicola* Fp-7 – 3,2 \pm 0,1; *T. versicolor* It-1 – 6,4 \pm 0,3; *T. biforme* Tb-4-1 – 4,4 \pm 0,2; *I. obliquus* Inon-1 – 5,8 \pm 0,3; *C. puteana* Cp-1 – 3,6 \pm 0,4. Показано, что перспективным продуцентом фенолов является *T. versicolor* It-1 [34].

Качественный и количественный анализ метаболитов, образующихся в культурах мицелия *I. obliquus* представлен в работе [43]. Проведено сравнение культур, выделенных из склероция, растущих на березе, ольхе и грабе. В метанольных экстрактах всех выделенных штаммов идентифицированы четыре фенолкарбоновые кислоты: п-гидроксibenзойная, протокатехиновая, кофейная и п-кумаровая.

Пигменты. В процессе своей жизнедеятельности базидиомицеты, таких родов как *Inonotus*, *Agaricus*, *Pleurotus*, *Phellinus* и другие, накапливают пигменты меланинового типа. Виды *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* и *Pleurotus cornucopiae* синтезируют такие пигменты от 6,1 до 11,0 мг/г [44], а *Auricularia auricular* – 2,2 мг/г [45]. Гриб *Schizophyllum commune* продуцирует экзомеланин в количестве 250 мкг/л культуральной жидкости [46]. Кроме того, меланины грибов обладают широким спектром биологических свойств, включая противовирусные, противоопухолевые, противоязвенные, иммуностимулирующие, противовоспалительные и антиоксидантные [47].

Среди трутовых грибов наилучшим продуцентом меланина является *I. obliquus*. Выход меланина из культуральной жидкости *I. obliquus* SUB2092728 составляет 2,06 % от сухих веществ. Выделенный меланин обладает антиоксидантными свойствами [48]. Внеклеточный меланин *I. obliquus* F-1244 эффективен в отношении вируса гриппа A/H1N1pdm09 (IC₅₀) – 47 мкг/мл [49]. Показано, что меланин, выделенный из культивируемой биомассы гриба *I. obliquus*

SUB2092728 не уступает по антиоксидантным свойствам природному меланину ($110,21 \pm 3,56$ и $129,45 \pm 3,36$ мг/г). Содержание меланина в биомассе данной культуры составляет 10 % [48].

В работе [50] проведены эксперименты по интенсификации биосинтеза меланина во время выращивания культуры *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., (1878) с помощью света определенной длины волны или окислительного стресса, который индуцировали активными формами кислорода (АФК) или активными формами азота (АФА). Показано, что воздействие АФА на культуру гриба значительно повышает биосинтез меланина.

Повысить синтез меланина можно изменяя значения pH питательной среды. Выявлено, что при культивировании грибов *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev., (1824) штаммы UAMH 11518, UAMH 11519, UAMH 11520; *T. versicolor* штаммы Mad697; R105; UAMH 11521; *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., (1821) штамм UAMH 11653; *Polyporus brumalis* (Pers.) Fr., (1818) штамм UAMH 11652; *F. fomentarius* штамм UAMH 11654; *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst., (1879) штамм F2037, на агаризованном солодовом экстракте с pH в диапазоне от 2 до 8 максимальная пигментация отмечается при pH 4-5,5. За исключением *Scytallidium cuboideum* (Sacc. & Ellis) Sigler & Kang, (2010), у которого интенсификация биосинтеза красного, не меланинового пигмента, наблюдается при pH 6, а синего при pH 8 [51].

Среди базидиомицетов есть активные продуценты каротиноидов, такие как грибы рода *Tremella*, *Agaricus*, *Cantharellus* и *Cordyceps*. Они способны синтезировать β -каротин, астаксантин, торулен и другие соединения [52]. Например, *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, (1946) и *Pleurotus ostreatus* накапливают β -каротин в количестве 40 мкг/г и 30 мкг/г соответственно. Содержание β -каротина в *Tricholoma acerbum* (Bull. ex Pers.) Quél., (1872) составляет 75,48 мкг/г, тогда как ликопина – 39,65 мкг/г [53]. В плодовых телах *Cordyceps militaris* (L.) Fr., (1818) обнаружены новые классы каротиноидов – кордиксантины I-IV, концентрация которых составляет 289 мкг/г, 235 мкг/г, 401 мкг/г и 175 мкг/г соответственно [54].

Каротиноиды могут оказывать иммуномодулирующее действие, предотвращать окислительный стресс и остеопороз, способствовать укреплению костей, а также обладают противовирусной, антимикробной и противоопухолевой активностью [54]. Богатое разнообразие БАВ грибов показывает возможность использования в биотехнологиях не только их мицелий, но и экзо- и эндометаболиты.

1.2 Биотехнологический потенциал грибов рода *Daedaleopsis*, *Pycnoporellus* и *Trichaptum*

Daedaleopsis tricolor (Bull.) Bondartsev & Singer, (1941), *Pycnoporellus fulgens* (Fr.) Donk, (1971) и *Trichaptum abietinum* (Dicks.) Ryvardeen, (1972) – древесные ксилотрофные грибы, участвующие в разложении органических веществ в лесных экосистемах. Грибы относятся к разным семействам: *D. tricolor* к семейству *Polyporaceae*, *P. fulgens* к семейству *Fomitopsidaceae*, а *T. abietinum* к семейству *Hymenochaetaceae*.

Daedaleopsis встречается в Северной Америке, Европе и Азии. В России распространен во многих регионах Сибири и Дальнего Востока. Растет преимущественно на стволах, пнях в лиственных и смешанных лесах. Наиболее широкий спектр субстратов характерен для *Daedaleopsis tricolor*. Чаще всего встречающимися видами на территории России считаются *Daedaleopsis confragosa*, *Daedaleopsis tricolor* [55,56].

На древесном опаде хвойных пород в древостоях зоны смешанных лесов на коре сосны, березы, бука растут базидиомицеты рода *Pycnoporellus*. Широко встречается в Корее, Европе, России, Северной Америке [57].

Грибы рода *Trichaptum* можно встретить в хвойных и смешанных лесах. В природе плодовое тело растёт на древесине хвойных пород и березе. Широко распространен в Северной Америке, Европе, Азии [55,58].

Содержание белков в водных экстрактах из плодовых тел *T. biforme*, *D. tricolor* и *D. confragosa* составляет 7,9, 4,4 и 11,3 г/л соответственно. В эта-

нольных экстрактах их количество у *T. biforme* – 14,0 мг/г, *D. tricolor* – 5,0 мг/г и *D. confragosa* – 4,1 мг/г [28].

В дихлорметановом экстракте дикорастущего гриба *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor* (Bolton) J. Schrö (1888) с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС), ядерной магнитно-резонансной спектроскопии были идентифицированы 3 α -карбоксияцетоксикверциновая кислота, 3 α -карбоксияцетокси-24-метилен-23-оксоланост-8-ен-26-оиновая кислота и 5 α ,8 α -эпидиоксиэргоста-6,22-диен-3 β -ол [59].

Фракция н-гексана и дихлорметана метанольного экстракта лесных плодовых тел *D. confragosa* содержат пять производных эргостерола, среди которых деметилинцистерол А₃, оказывает антибактериальный эффект против *H. pylori* эффективнее, чем кверцетин [60].

Согласно литературным данным в водных и этанольных экстрактах базидиомицетов *D. tricolor* и *D. confragosa* природного происхождения содержание фенольных соединений и флавоноидов приблизительно в два раза больше по сравнению с экстрактами из культивируемого мицелия [61,62].

В исследовании [63] из собранных плодовых тел гриба *D. tricolor* был выделен и очищен меланин. Часть меланина была модифицирована с L-аргинином. Полученные меланины были протестированы на способность защиты от ультрафиолета при добавлении их к крему Nivea и солнцезащитному крему Olay в концентрации 4, 7 и 10 % по массе. Выявлено, что показатель Sun Protection Factor (SPF) кремов Nivea и Olay увеличивался на 87 % и 35 % соответственно при концентрациях меланина 10 %. Причем не модифицированные меланины показали более высокий рост SPF по сравнению с модифицированными.

Этанольный экстракт природных плодовых тел *P. fulgens* в концентрации 400 мкг/мл полностью разрушает цитоплазму и клеточную стенку *Candida glabrata* [64]. В другом исследовании [65] установлена минимальная ингибирующая концентрация (15 мкг/мл) экстракта, полученного аналогичным способом, в отношении *Candida albicans* ATCC 2091 и Y 0109, а также *Candida glabrata* LM 774.

Метанольный экстракт из плодовых тел *T. biforme*, выросших в природе, содержит, в %: метиловый эфир гексадекановой кислоты – 6,32; пальмитиновую кислоту – 1,52; цис-9,цис-12-октадекадиеновую кислоту метилового эфира – 49,7; 9-октадеценамид (Z) – 10,25; эргостерол – 5,1. Таким образом, экстракт содержал 67,8 % жирных кислот от экстрактивных веществ, в том числе 50,0 % из них ненасыщенных [66].

В работе [67] проанализированы экстракты плодовых тел пяти грибов, в том числе *Trichaptum abietinum*, собранных в Заповедной зоне Гауришанкар в Гималаях Непала. Установлено, что в исследуемом экстракте *T. abietinum* содержится фенолов – $0,26 \pm 0,02$ мг/г, флавоноидов – $1,19 \pm 0,61$ мг/г, белка – $4,45 \pm 0,21$ мг/100 г, β -каротина – $0,041 \pm 0,01$ мг/г, ликопина – $0,034 \pm 0,000$ мг/г и витамина С – $0,015 \pm 0,001$ мг/100 г. Ингибирование 50 % радикаловДФП происходит при концентрации >25 мг/г.

Nowaska N. с соавторами [68] изучен химический состав и биологическая активность этанольных экстрактов 31 вида природных грибов из Польши, включая *T. fuscoviolaceum* (Ehrenb.) Ryvardeen, (1972). Содержание фенольных соединений в экстракте этого гриба составляет $2,79 \pm 0,04$ мг/г, значение антирадикальной активности $IC_{50} = 59,54 \pm 2,01$ мг/г. Полученный экстракт содержит следующие фенолкарбоновые кислоты, мкг/г: протокатеховую – $1,89 \pm 0,06$; 4-гидрокси-бензойную – $0,37 \pm 0,01$; ванилиновую – $0,75 \pm 0,002$; кумаровую – $0,03 \pm 0,0$; феруловую – $0,04 \pm 0,0$; салициловую – следы.

Спиртовые, водные и щелочные экстракты природных плодовых тел *T. abietinum* обладают противовоспалительным эффектом, и ингибируют рост линии раковых клеток HeLa [69].

В связи с тем, что устойчивость микроорганизмов к антибиотикам становится все более распространенной проблемой, грибы можно рассматривать как потенциальный источник новых классов соединений, обладающих антимикробной активностью. Одним из первых антимикробных соединений, выделенных из базидиомицетов, был биформин, полиацетиленовый карбинол, кото-

рые продуцирует *T. biforme*. Данное соединение активно против широкого спектра бактерий и грибов [70,71].

В исследовании [72] было показано, что экстракт, выделенный из гриба *T. biforme* ингибирует рост *E. coli* ATCC 25922 (зона ингибирования 28 мм) и *S. aureus* ATCC 25923 (зона ингибирования 13 мм). Также проведен анализ исследуемых экстрактов с помощью ГХ-МС, который позволил идентифицировать 30 соединений, в т.ч. октодрин, оксид кариофиллена, фенольные соединения, жирные кислоты (пальмитиновую кислоту, фталевую кислоту) и сложные эфиры жирных кислот. Авторы предполагают, что этими соединениями обусловлено антимикробное действие полученных экстрактов.

Выращивание грибов биотехнологическим путем позволяет за более короткое время получить те метаболиты, которые в природе накапливаются долгое время. Другим преимуществом является отсутствие отрицательного воздействия внешних факторов на метаболизм базидиальных культур. Изменяя условия их культивирования, появляется возможность влиять на процесс роста, накопление биомассы и количество целевого продукта. Исследуемые три рода грибов отличаются по морфологии, выращиванию, а также по синтезируемым ими соединениям. Анализ литературных данных показал, что грибы рода *Daedaleopsis*, *Pycnoporellus* и *Trichaptum* являются продуцентами уникальных метаболитов, которые представляют интерес для фармации и биотехнологии. Помимо этого, они перспективны для разработки биотехнологии культивирования, поскольку имеют быструю скорость роста и за короткое время способны накапливать большое количество биомассы. Например, при культивировании на плотных питательных средах скорость роста разных штаммов *D. tricolor* составляет 4,5-8,8 мм/день [56,73,74], а *T. abietinum* 0,9-8,2 мм/день [73,75,76]. Количество биомассы *D. tricolor* LE-BIN 2266 составляет практически 300 мг на 15 сутки выращивания на агаризованном пивном сусле. Для сравнения, у грибов *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr (1821) и *Lignomyces vetlinianus* (Domaski) R.H. Petersen & Zmitr. (2015) скорость роста составляет 0,5 и 2,9 мм/день соот-

ветственно, а концентрация биомассы 130 мг (29 сутки) и 140 мг (35 сутки) соответственно при аналогичных условиях культивирования [77].

Для получения большого выхода биомассы, а также целевых метаболитов, грибы, как правило, выращивают жидкофазным способом. При погруженном культивировании *D. tricolor* (штаммы Db-14, Db-18, Dr-17) на питательных средах различного состава, к 5-7 суткам способны накапливать до 14,4 г/л биомассы. Отмечено, что наибольший выход биомассы мицелия всех исследуемых штаммов наблюдается на питательной среде, содержащей крахмал и кукурузный экстракт, и наиболее продуктивным по ее накоплению является штамм *D. tricolor* Db-14 [78].

Наряду с родами *Daedaleopsis* и *Trichaptum*, данные по культивированию *Pycnoporellus* практически отсутствуют. Это может быть связано с тем, что некоторые виды *Pycnoporellus* считаются редкими и внесены в красную книгу, например, *P. fulgens* занесен в красную книгу Вологодской области [79], а *P. alboluteus* (Ellis & Everh.) Kotl.&Pouzar (1963) Амурской области [80]. Плодовые тела грибов данного рода окрашены в желтый, ярко оранжевый цвет [81], что свидетельствует о наличии в них пигментов, которые можно применять в качестве антиоксидантов либо пищевых красителей.

В настоящее время активно изучаются не только плодовые тела, но и культивируемый мицелий этих родов. В работе [82] показано, что этилацетатная фракция метанольного экстракта мицелия *P. fulgens* поглощает приблизительно 10 и 17 % радикалов АБТС и ДФПГ соответственно. Данные результаты показывают перспективу дальнейшего изучения базидиомицетов данного рода, подбор условий их культивирования и изучения их экзо- и эндометаболических веществ – антиоксидантов.

Авторами [83] определено, что гексановая фракция этилацетатного экстракта мицелия *Trichaptum* sp. содержит $13,14 \pm 0,43$ мг/г фенольных соединений, диэтиловая фракция – $56,98 \pm 0,11$ мг/г и этанольная фракция – $65,70 \pm 0,87$ мг/г.

Фракция диэтилового эфира данного экстракта ингибировала рост всех тест-культур *S. aureus*, *E. coli* и *S. thypi* при концентрации 125 мкг.

Водный экстракт мицелия *T. biforme* Tb-4-1 оказывал цитотоксический эффект (ЛД₅₀) на линию лейкозных клеток K562 и линию опухоли молочной железы HBL-100 в концентрации 58 и 94 мкг/мл соответственно [34].

Особый интерес для биотехнологий представляет культуральная жидкость, которая содержит метаболиты, проявляющие биологически активные свойства. Например, из культуральной жидкости базидиомицета *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvar den, (1972) были выделены два новых сесквитерпеноида, а также пять известных соединений [84]. Кроме того, из этилацетатного экстракта культуральной среды *Trichaptum pargamenum* (Fr.) G. Cunn. были извлечены два новых сесквитерпена кадианового типа – трихапаргин А, который проявляет слабую активность в отношении клеток SW480 рака толстой кишки человека со значением IC₅₀=24,8 мкМ и трихапаргин В [85].

В работе [86] из объединенного этилацетатного экстракта культуральной жидкости и метанольного экстракта культивируемого мицелия гриба *D. tricolor* выделены: четыре новых бисаболановых сесквитерпеноида дедатрины А–D, сесквитерпеновый 12-гидрокси- α -кадиол и производное гептаноэргостерана дедатрин G, новый стерин, имеющий структуру эргоста-5,8,24(28)-триен-3 β -ол [87] (диэтиловый эфир), и 20(29)-люпен-3-он [88] (петролейный эфир). Последнее из перечисленных соединений обладает противогрибковой активностью в отношении *S. cerevisiae* и *M. gypseum*, антибактериальной активностью против *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. pyocyanea*, *B. subtilis* и *S. aureus*, а также антиоксидантными свойствами в модели перекисного окисления липидов на 6,4 %.

Сведения о терапевтическом потенциале представителей рода *Trichaptum* и *Daedaleopsis* приведены в работах [34,61,62,64,65,67-69,72,82,83,85,88-95]. В таблице 1.1 представлена биологическая активность некоторых видов данных родов, которая составлена по литературным данным.

Таблица 1.1 – Биологическая активность грибов рода *Daedaleopsis* и *Trichaptum*

Гриб	Вид сырья	Препарат	Биологическая активность	Ссылка
<i>D. tricolor</i>	Плодовое тело	Петролейный экстракт	Антифунгальная, антимикробная, антиоксидантная	[88]
	Плодовое тело	Водный экстракт	Антиоксидантная, цитотоксическая, противовирусная	[62,91]
		Этанольный экстракт		
	Мицелий	Водный экстракт		
Этанольный экстракт				
<i>D. confragosa</i>	Плодовое тело	Этанольные, метанольный и водный экстракты	Антиоксидантная, антифунгальная, генопротекторная	[61]
	Мицелий			
	Культуральная жидкость	Метанольный экстракт	Антимикробная	[92]
	Мицелий	Фракции этилацетатного экстракта	Антимикробная, антиоксидантная	[83]
<i>P. fulgens</i>	Плодовое тело	Этанольный экстракт	Противогрибковая	[64,65]
	Мицелий	Этилацетатная фракция метанольного экстракта	Антиоксидантная	[82]
<i>Trichaptum sp.</i>	Мицелий	-	Ферментативная	[93]
	Плодовое тело	Этанольный и водные экстракты	Антиоксидантная	[89]
<i>T. abietinum</i>	Плодовое тело	Метанольный экстракт	Антиоксидантная	[67]
	Плодовое тело	Метанольный, этанольный, водный и щелочной экстракты	Противовосполительная, иммуномодулирующая, противоопухолевая	[69]
	Плодовое тело	Этанольный и водный экстракты	Антиоксидантная антибактериальная	[89,90]
<i>T. biforme</i>	Плодовое тело	Метанольный, этанольный и этилацетатный экстракты	Антибактериальная	[72]
	Мицелий	Метанол:хлороформный экстракт	Цитотоксическая, антипролиферативная	[34]
	Мицелий	Водный экстракт	Антиоксидантная	[34]
	Культуральная жидкость	-	Ферментативная	[94,95]
	Плодовое тело	Этанольный экстракт	Противомикробная, антиоксидантная	[68]
<i>T. pargamentum</i>	Культуральная жидкость	Этилацетатный экстракт	Противоопухолевая	[85]

Согласно представленным в таблице 1.1 данным *Daedaleopsis confragosa* и *Trichaptum biforme* являются наиболее изученными грибами. Наряду с плодовыми телами активно исследованы биологически активные свойства экстрактов из мицелия и культуральной жидкости, которые обладают антиоксидантной, антимикробной, противоопухолевой и т.д. активностью. Накапливаемые в биомассе и экзометаболиты грибов рода *Daedaleopsis*, *Pycnoporellus* и *Trichaptum* пред-

ставляют интерес, поскольку их можно применять в различных областях - биотехнологии, фармацевции, медицине, косметологии, пищевой промышленности.

1.3 Биопродукты на основе культивируемых базидиомицетов

Универсальность грибов делает их незаменимыми в современной биотехнологии, они играют важную роль в промышленном производстве пигментов, витаминов, ферментов и других биологически активных соединений. В последние годы мировое производство их плодовых тел и мицелия резко увеличилось, что обусловлено растущей популярностью лекарственных, косметических и функциональных продуктов на их основе [96]. Биопродукты можно получить не только из мицелия, но и из культуральной жидкости, поскольку она является источником ферментов, а также антиоксидантов, например, полисахаридов, фенольных соединений, меланинов.

Совсем недавно появились новые тенденции отхода от традиционной биотехнологии и использования мицелия грибов в качестве экологически чистого сырья при изготовлении биокомпозитов, биотоплива и материалов, таких как биоцемент, биоблоки, и производстве искусственной мицелиальной кожи [97-103]. Кроме того, материалы на основе их биомассы применяются в электротехнике (рис. 1.2) [104-106].

К инновационным биопродуктам на основе базидиомицетов относятся искусственная кожа, биопластики, микроэлектроника.

Для получения продуктов на основе грибной биомассы чаще всего используют *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *T. versicolor*, *A. bisporus*. Поскольку дереворазрушающие грибы могут легко расти на органических отходах, они представляют интерес для создания на их основе продуктов будущего. Помимо этого они не содержат вредных веществ, пригодны для вторичной переработки и имеют низкую стоимость [107].

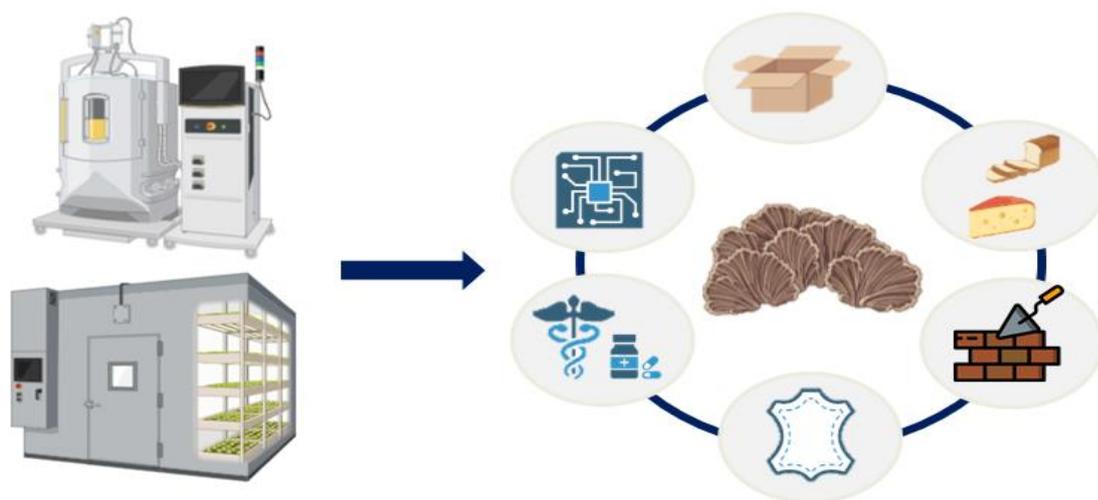


Рисунок 1.2 – Биопродукты на основе грибной биомассы

Кожа на основе мицелия, полученная из различных грибов, обладает механическими свойствами, сравнимыми с традиционной кожей, особенно при армировании такими подложками, как войлок. Американские компании, такие как Ecovative Design LLC и MycoWorks, получили несколько патентов на производство такой кожи. В исследовании [108] показано, что из 14 видов грибов наиболее перспективным для производства мицелиальной кожи является *Fomitella fraxinea* (Bull.) Imazeki, (1989), т.к. полученный продукт обладает высокой прочностью [109].

Биопластик и упаковка на основе *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *A. bisporus* высоко стабильны, гибкие и механически прочные (выдерживает до 299 кПа) [107], а композит *T. versicolor* показал биоразлагаемость через 12 недель, совместимость с пенополистиролом, с механическими свойствами до 235 кПа, но с очень высоким водопоглощением [110]. Инновационные подходы, такие как обработка глицерином, позволили повысить прочность и гидрофильность пленок из мицелия *A. bisporus*, что еще больше улучшило качество получаемого упаковочного материала [111].

Использование грибного мицелия в биокомпьютерах и биосенсорике – это развивающаяся область, которая раскрывает потенциал их использования в качестве вычислительных устройств и сенсоров [112-115]. В основе разработок

компьютеров и электроники, используются производимые грибами импульсы, похожие на потенциал действия, аналогичные передаче сигналов нейронами в головном мозге [116]. Показано, что мицелий грибов увеличивает проводимость и скорость коммуникации при стимуляции в двух отдельных точках. Различная геометрия мицелия позволяет вычислять разные логические функции, которые могут быть отображены на основе его электрических реакций [113].

Пищевая и фармацевтическая промышленность. Базидиомицеты стали неотъемлемой частью фармацевтических инноваций, поскольку они синтезируют антимикробные, противоопухолевые, иммуномодулирующие и т.п. соединения, которые продолжают играть важную роль в современной медицине [70,71,117].

Рынок грибных БАД увеличивается с каждым годом. Они востребованы не только в Китае, Тайланде, Вьетнаме, но и России, что говорит о популярности и высоком спросе на данную продукцию. При производстве пищевых и биологически активных добавок, базидиомицеты, как правило, выращивают на твердых субстратах, такие как овес, зерно, рис и т.д. [118-120]. Так, компания «Om Mushrooms» выпускает БАД на основе мицелиальной биомассы *Trametes versicolor*, *Hericium erinaceus*, выращенными на овсе, а «Solaray» – на основе *Lentinula edodes*. Гриб *Inonotus obliquus* культивируют на коричневом рисе (производитель «Fungi Perfecti Host Defense»). Отечественный рынок БАД на основе базидиомицетов также разнообразен. Например, бренд «Русские корни» производит зерномицелий *Cordyceps militaris*, *Hericium erinaceus*.

Для получения БАД и лекарственных препаратов на основе экзо- или эндометаболитов базидиомицетов, ферментов, их культивируют на синтетических питательных средах с разнообразными источниками углерода и азота, в ферментерах [118,121]. Выращивание глубинным способом в биореакторах имеет преимущества перед твердофазным способом. Например, легче контролировать процесс (температура, аэрация), сокращается продолжительность культивирования, следовательно, снижается риск контаминации. Компания ООО «Арт-

лайф» выращивает 13 видов грибов глубинным способом. В ее коллекцию входят как хорошо известные культуры, так и редкие, среди которых, ежевик коралловидный (*Hericium coralloides*), пилолистник тигровый (*Lentinus tigrinus*), трутовик жестковолосистый (*Trametes hirsuta*) [122]. Получаемый таким способом мицелий можно применять в качестве пищевой и биологически активной добавки.

Биляловой А. С. разработана технология получения БАД «Летисуфурин» на основе биомассы *Laetiporus sulphureus* 3X, культивируемой глубинным способом. Выявлено, что данный препарат способен сорбировать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, что позволяет его применять в качестве энтеросорбента [123].

Горшиной Е. С. получена сухая активная биомасса *Trametes pubescens* 923-2, сертифицированная как пищевая добавка. Она проявляет высокую биологическую активность, подтвержденную клинически, а именно онкостатическую, гепатопротекторную и иммуномодулирующую [124].

К БАД, содержащим метаболиты грибов, можно отнести экстракты из их мицелия. Содержание β -глюканов в экстракте *Tremella fuciformis*, *C. militaris*, *T. versicolor* составляет не менее 10, 25 и 30 % соответственно. Выпускают препараты, содержащие экстракты и/или мицелий нескольких разных культур. Такой состав обеспечивает их комплексное действие.

Проанализировав рынок грибных БАД и их состав, можно сказать, что большинство БАД стандартизированы по содержанию в них β -глюканов, которые оказывают иммуностимулирующее и антиоксидантное действие на организм человека. Стоимость 30 дневного курса варьируется от 1600 до 6200 руб.

Современным направлением является создание наночастиц, «загруженных» экстрактами грибов для адресной доставки активных метаболитов с сохранением их терапевтических свойств. Так, синтезированы наночастицы кремния с экстрактом *Ganoderma pfeifferi*, обладающие высокой антиоксидантной активностью [125].

Грибная биомасса, экстракты или полисахариды из базидиомицетов применяются для создания функциональных продуктов питания. Так, в литературе имеются сведения об обогащении хлеба и пасты глюканами из *L. edodes*, снеков экстрактом *A. bisporus* [126], экстракты *Suillus luteus* и *Coprinopsis atramentaria* для изготовления творога [127] и *S. commune* для производства сыра [128]. Полученные функциональные продукты обладают антиоксидантными и гиполипидемическими свойствами, профилактическим действием против рака и тромбоза. При разработке технологии получения таких функциональных продуктов необходимо учитывать процессы обработки, взаимодействия соединений, поскольку они могут влиять на биологическую активность таких продуктов.

Как представлено в литературном обзоре культивируемый мицелий и метаболиты, секретируемые в культуральную среду базидиомицетами, содержат БАВ, обладающие антиоксидантными, генопротекторными, цитотоксическими, антипролиферативными, противоопухолевыми, противовирусными, антимикробными и антифунгальными свойствами. В связи с этим введение в культуру новых штаммов грибов, изучение их метаболитов и способов их получения является актуальным направлением исследований. Таким образом, на основании литературных данных, можно сделать вывод, что базидиальные грибы *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum* представляют интерес для разработки инновационных биотехнологий для получения БАД, косметических средств и лекарственных препаратов широкого спектра действия.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы, использованные в работе

Характеристика химических реактивов, использованных в работе: серная кислота (о.с.ч.); соляная кислота (х.ч.); гидроксид аммония (х.ч.); гидроксид натрия (х.ч.); молибдат аммония (ч.); ортофосфат натрия (ч.); дигидроортофосфат калия (ч.); гидроортофосфат калия (ч.д.а.); магниевый сернокислый 7-водный (х.ч.); нитрат серебра (ч.д.а.); перманганат калия (х.ч.); хлорид железа (III) 6-водный (ч.); железистоаммонийные квасцы 12-водные (ч.д.а.); 1,10-фенантролин моногидрохлорид моногидрат 1-водный (ч.д.а.); 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (95 %); аскорбиновая кислота (ч.д.а.); галловая кислота (99 %); пирокатехин (ч.); дигидрокверцетин (99 %); резорцин (99 %); гидрохинон (99 %); ланостерол (93 %); ситостерол (95 %); D-глюкоза (х.ч.); этиловый спирт (95 %); уксусная кислота (99,5 %); дрожжевой экстракт (аминный азот $\geq 4,0\%$); пептон (ООО НПО «Порт-Петровск»); агар сухой микробиологический для бактериальных целей («С.Е. Roeser GmbH», Германия), соевый изолят (ООО «Удача»).

Введенные в культуру и зарегистрированные в базе данных GenBank базидиомицеты: *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12, *Trichaptum abietinum* KS10.

Аптечные препараты, использованные в работе: амоксициллин (ООО «Барнаульский завод медицинских препаратов», Россия); энтегнин (лигнин гидролизный, ООО НПФ «БиоТон, Россия»); пищевые добавки, содержащие мицелий грибов *Cordyceps* (ООО «Компания Хорст») и *Trametes versicolor* (NS Organic).

Культивирование проводили на питательных средах следующего состава:

1. Сабуро, (г/л): декстроза – 40; бактериологический агар – 15; смесь пептического перевара животной ткани и панкреатического гидролизата казеина (1:1) – 10; вода – до 1 л;

2. Чапека, (г/л): хлористый калий – 0,5; сахароза – 30; глицерофосфат магния – 0,5; сульфат железа – 0,01; сульфат калия – 0,35; нитрат натрия – 2; бактериологический агар – 12; вода – до 1 л;

3. глюкозо-картофельная агаризованная (ГКА), (г/л): картофель – 200; глюкоза – 20; агар – 20; вода – до 1 л. К измельченному картофелю добавляли водопроводную воду и кипятили в течение 30 минут. Картофельный отвар остужали, фильтровали через марлевый фильтр и доводили объем до 1 л водопроводной водой. Далее в картофельный отвар вносили глюкозу и агар.

4. глюкозо-пептонная агаризованная (ГПА), г/л: глюкоза – 30; пептон – 5; дигидроортофосфат калия – 1; магний серноокислый – 5; агар – 20; вода – до 1л;

5. синтетическая с дрожжевым экстрактом агаризованная, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; микробиологический агар – 20; вода – до 1л;

6. с дрожжевым экстрактом, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; вода – до 1л;

7. синтетическая с дрожжевым экстрактом и энтегнином агаризованная, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; энтегнин – 0,01; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; микробиологический агар – 20; вода – до 1л;

8. с дрожжевым экстрактом и энтегнином, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5; энтегнин – 0,01; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; вода – до 1л;

9. с соевым изолятом, г/л: глюкоза – 20; соевый изолят – 5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; вода – до 1л;

10. с соевым изолятом и энтегнином, г/л: глюкоза – 20; соевый изолят – 5; лиггнин – 0,01; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; вода – до 1л;

11. синтетическая с соевым текстуратом, г/л: глюкоза – 20; соевый текстурат – 5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний серноокислый – 0,5; вода – до 1л;

12. комбинированная, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 2,5; соевый изолят – 2,5; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний сернокислый – 0,5; вода – до 1л;
13. оптимизированная, г/л: глюкоза – 10; дрожжевой экстракт – 2,5; соевый изолят – 3,0; дигидроортофосфат калия – 0,5; магний сернокислый – 0,5; вода – до 1л.
14. неизмельченная лузга подсолнечника;
15. измельченная лузга подсолнечника до размера частиц 1-2 мм;
16. измельченная лузга с добавлением овсяных отрубей: к 100 г измельченной лузги подсолнечника добавляли 1 г овсяных отрубей.

2.2 Выделение чистых культур грибов

Чистую культуру выделяли из плодовых тел природных грибов *D. tricolor*, *P. fulgens*, *T. abietinum*. Для дезинфекции тканевые инокуляты обрабатывали 0,5 % раствором перманганата калия в течение 15 минут. Затем помещали инокулят плодового тела гриба на среду ГКА, содержащую амоксициллин в количестве 0,1 г/л, и культивировали в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при температуре 27 ± 2 °С в течение 5-7 дней. Выросшие колонии многократно пересевали и изучали макро- и микроморфологию. Микроскопирование мицелия проводили на микроскопе (МС 100 (LCD PC), Австрия) при увеличении 400 раз по п. 2.8.2. Культуры хранили на ГКА при температуре 4 ± 2 °С и пересевали на свежеприготовленную среду каждые три месяца. Микроскопический контроль проводили при каждом пересеве. Идентификацию и получение первичных нуклеотидных последовательностей ДНК выделенных колоний грибов выполняли по п. 2.8.1. Результаты приведены на рисунке 3.4.

2.3 Культивирование *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12, *Trichaptum abietinum* KS10 на плотных питательных средах

Выращивание новых выделенных штаммов грибов проводили на следующих плотных питательных средах: Сабуро, Чапека, ГКА, ГПА, синтетическая с дрожжевым экстрактом и синтетическая с дрожжевым экстрактом и энтегнином (№ 1-5, 7) [129,130]. Заранее простерилизованным методом фламбирования скальпелем вырезали инокулят 5-7 суточных культур диаметром до 5 мм и помещали их по центру агаризованных питательных сред на чашках Петри. Культивирование осуществляли в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия). Для определения оптимальной температуры культивирования грибов использовали следующие температурные режимы: 15 °С, 24 °С, 27 °С, 37 °С. Определение радиальной скорости роста и количества биомассы осуществляли по п. 2.8.3 и 2.8.4. Полученные результаты приведены в таблицах 3.2, 3.3 и рисунках 3.5, 3.6.

2.4 Твердофазное культивирование *T. abietinum* KS10

Для твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10 использовали стерильную шелуха подсолнечника: неизмельченную, измельченную, а также измельченную с внесением 1 % овсяных отрубей. Толщина среды в чашках Петри составляла 2-3 мм, влажность субстрата от 75 до 80 %. Культивирование грибов проводили при температуре 27° С, при рН 6. Определение скорости роста базидиомицета на лузге подсолнечника осуществляли с помощью расчета среднесуточной скорости роста (ССР) по п. 2.8.15. Упаковочный композиционный материал получали прессованием при температуре 150 °С. Результаты отображены в таблице 3.4 и рисунках 3.8, 3.9.

2.5 Погруженное культивирование грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10

Посевной материал базидиальных грибов выращивали при температуре 27 ± 2 °C в течение 5-7 суток в шейкере-инкубаторе (Infors HT Ecotron, Швейцария) при 200 об/мин. Для этого в колбу с питательной средой вносили 10-15 инокуляционных блоков музейных культур, хранящихся на скошенном ГКА, диаметром 2-3 мм. Затем пересевали на те же среды в количестве 10 % по объему.

Гриб *D. tricolor* KS11 культивировали на среде с дрожжевым экстрактом (№ 6), с соевым изолятом (№ 9), комбинированной (№ 12) и оптимизированной (№ 13). *P. fulgens* KS12 выращивали на среде, содержащую соевый изолят (№ 10) и дрожжевой экстракт (№ 8) с добавлением в них энтегина. Базидиомицет *T. abietinum* KS10 культивировали на следующих средах: с дрожжевым экстрактом (№ 6), с соевым изолятом (№ 9), с соевым текстуратом (№ 11). Процесс проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды в шейкере-инкубаторе (Infors HT Ecotron, Швейцария) при 200 об/мин, температуре 27 ± 2 °C в течение 3-16 суток. Количество посевного материала – 10 % по объему. Концентрацию биомассы и ее зольность определяли по п. 2.8.4, 2.8.8. Результаты приведены на рисунках 3.8-3.10, таблице 6.15 и 6.16. Определение содержания сухих веществ и зольности культуральной жидкости проводили по п. 2.8.7, 2.8.8. Полученные экспериментальные данные показаны в таблице 5.1. У высушенных конвективно-кондуктивным способом экзометаболитов измеряли содержание фенольных соединений, флавоноидов, простых фенолов и антиоксидантные свойства по методикам, описанным в п. 2.8.9-2.8.14. Результаты представлены в таблице 4.1 и 6.16. Выделение эндопигментов, проведение качественных реакций, ИК-спектроскопии и определение их антиоксидантных свойств осуществляли по п. 2.8.5, 2.8.6, 2.8.12-2.8.14. Результаты представлены в таблицах 4.4, 6.16 и рисунке 4.5.

2.6 Получение экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12

Культуральную жидкость *P. fulgens* KS12, полученную на среде с дрожжевым экстрактом (№ 8) и соевым изолятом (№ 10) на 11 и 15 сутки выращивания, экстрагировали гексаном, хлороформом, этанолом, ацетоном и этилацетатом в соотношении 1:1, с использованием делительной воронки [131]. Полученные экстракты высушивали при комнатной температуре. Определение антирадикальной активности проводили согласно п. 2.8.14, качественный состав фенольных и липофильных соединений по п. 2.8.16. Результаты показаны в таблицах 4.2, 4.3 и рисунке 4.4.

2.7 Масштабирование процесса погруженного культивирования

***D. tricolor* KS11 на средах различного состава**

Культивирование *D. tricolor* KS11 проводили в колбах объемом 0,75 л, 1 л и 2 л, содержащие 200 и 400 мл соответственно среды с соевым изолятом (№ 10), комбинированной (№ 12) и оптимизированной (№ 13) в течение 4-5 суток, температуре 27 ± 2 °C и 200 об/мин. Количество посевного материала – 10 % по объему, выращенного на той же среде. Концентрацию биомассы определяли согласно п. 2.8.4. Результаты представлены в таблице 5.2.

2.8 Общие методы анализа

2.8.1 Секвенирование по методу Сэнгера

Определение первичных нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Постановку сиквенсной реакции осуществляли с использованием ген-специфических праймеров ITS1 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) и ITS4 (5- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3), а также набора реактивов Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Использовали 2–5 мкл очищенного ПЦР-продукта

в количестве от 10 до 50 нг, в зависимости от длины ПЦР-продукта, добавляли 1 мкл 3,2 пико Моль праймера, 0,8 мкл Ready Reaction Mix, 1,6 мкл 5X Sequencing Buffer и воду до объема 10 мкл. Для подтверждения мутации прочтение осуществляли с обоих праймеров (прямого и обратного). Реакцию проводили с использованием амплификатора Veriti (Applied Biosystems, США) по следующему температурному протоколу: предварительная денатурация при 96 °С – 1 мин; 26 циклов при 96 °С по 10 с, 50 °С – 5 с, 60 °С – 4 мин. Секвенирование продуктов ПЦР осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США) на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета [48,132].

2.8.2 Микроскопирование

Мицелий микроскопировали методом «раздавленной капли» при увеличении $\times 400$ на микроскопе (MC 100 (LCD PC), Австрия) [133].

2.8.3 Определение радиальной скорости при культивировании на плотных питательных средах

Высечку мицелия инокулировали как по середине, так и по краю чашки Петри, чтобы позволить грибной колонии распространиться по всему диаметру чашки. Определение радиального роста колонии гриба проводили измерением его двух взаимно перпендикулярных диаметров для дальнейшего вычисления радиуса и площади. Рост регистрировали ежедневно [134].

2.8.4 Определение количества биомассы

Мицелий, выросший на поверхности плотной питательной среды, отделяли её плавлением на водяной бане. Затем промывали водой и высушивали при 40 ± 2 °С конвективно-кондуктивным способом на электросушилке (Oberhof

Fruchttrockner B-53, Китай). Количество биомассы определяли гравиметрически и рассчитывали на 1 см² площади колонии [134].

По окончании погруженного культивирования биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием под вакуумом. Биомассу сушили в конвекционной сушилке (Oberhof Fruchttrockner B-53, Китай) в течение 4 часов при температуре 40±2 °С. Количество биомассы грибов определяли гравиметрически.

2.8.5 Выделение эндопигментов

Пигменты меланинового типа выделяли из биомассы с помощью щелочного гидролиза. К навеске измельченной биомассы добавляли 2 % раствора едкого натра в соотношении 1:25 и кипятили в течение двух часов на водяной бане. Биомассу отфильтровывали, полученный экстракт подкисляли 25 % хлористоводородной кислотой до pH 2 для осаждения пигментов. Затем осадок центрифугировали (ПЭ-6910, Россия) при 4000 об/мин в течение 10 минут. Для очистки пигментов от хлорида натрия проводили многократное промывание дистиллированной водой и фугование осадка до тех пор, пока при внесении к супернатанту нитрата серебра не переставали выпадать хлопья. Очищенный пигмент высушивали при температуре 40±2 °С. Количество пигмента определяли гравиметрически и выражали в мг/г [135,136].

2.8.6 Качественные реакции на меланины

Готовили 0,1 % щелочной раствор эндопигментов и проводили качественные реакции с 0,1 М раствором перманганата калия и 5 % раствором хлорида железа (III) [137].

2.8.7 Определение содержания сухих веществ

Определение содержания сухих веществ проводили согласно ОФС.1.4.1.0021 [138].

2.8.8 Определение общей зольности

Определение общей зольности проводили согласно ОФС.1.2.2.2.0013.15 [139].

2.8.9 Определение содержания простых фенолов

К 5 мл исследуемого раствора приливали 0,3 мл 2 % раствора 4-аминоантипирина и 1 мл 2 н раствора аммиака. После перемешивания добавляли 1 мл 2 % раствора гексацианоферрата (III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) и снова перемешивали встряхиванием. Раствор приобретает красную окраску. Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре (Экрос, Россия) при длине волны 500 нм в кюветах толщиной 1 см против контроля – 5 мл дистиллированной воды со смесью тех же реактивов в тех же соотношениях.

Калибровочный график строили по растворам пирокатехина (10-30 мкг/мл). Значение выражали в мг эквивалент пирокатехина на г образца [140].

2.8.10 Определение содержания флавоноидов

К 0,2 мл исследуемого объекта добавляли 0,1 мл 2 % раствора хлорида алюминия и выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем приливали 0,65 мл 96 % этилового спирта и 0,05 мл 4 % раствора ацетата натрия. Измеряли оптическую плотность на микропланшетном ридере (TECAN Infinite 200 PRO, Австрия) при длине волны $\lambda=380$ нм. В качестве контроля использовали аналогично приготовленную смесь, заменив образец на 96 % этило-

вый спирт. Калибровочный график строили по дигидрокверцетину в концентрациях 10-200 мкг/мл. Содержание флавоноидов выражали в мг эквивалент дигидрокверцетина на г образца [78,141].

2.8.11 Определение общего содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу

К 200 мкл образца вносили 1000 мкл 10 % реагента Фолина-Чокальтеу и оставляли в темноте в течение 6 мин. Далее добавляли 800 мкл 7,5 % водного раствора Na_2CO_3 . Реакционную смесь энергично встряхивали и выдерживали в шейкере (Infors HT Ecotron, Швейцария) в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов. Измеряли поглощение реакционной смеси на микропланшетном ридере (TECAN Infinite 200 PRO, Австрия) при длине волны $\lambda=740$ нм. В качестве контроля использовали 70 % раствор этилового спирта. Общее содержание фенольных соединений определяли как мкг эквивалента галловой кислоты на г образца [142].

2.8.12 Определение общей антиоксидантной активности фосфомолибденовым методом

К 2 мл исследуемого образца вносили 2 мл фосфомолибденового реактива и инкубировали при температуре 95 ± 2 °С в течение 90 мин. Далее охлаждали до комнатной температуры и определяли оптическую плотность при длине волны $\lambda=695$ нм на микропланшетном спектофотометре (TECAN Infinite 200 PRO, Австрия). Калибровочный график строили по стандартным растворам кверцетина (20-100 мкг/мл). Значение выражали в мг эквивалент кверцетина на г образца [143].

2.8.13 Определение антиоксидантной активности с помощью реактива 1,10-фенантролин

К 0,5 мл раствора исследуемых объектов добавляли 0,2 мл фенантролинового реактива и 4,3 мл дистиллированной воды. Перемешивали и инкубировали на водяной бане при температуре 50 °С в течение 30 минут. Определяли оптическую плотность при длине волны $\lambda=510$ нм на микропланшетном ридере (TECAN Infinite 200 PRO, Австрия). Антиоксидантную активность рассчитывали по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам кверцетина в концентрациях 5-35 мкг/мл. Результаты выражали в мг эквивалент кверцетина на г образца [131,144].

2.8.14 Определение антирадикальной активности

К 0,1 мл образца добавляли 0,1 мл 0,2 мМДФПГ в 96% этиловом спирте (опытный раствор). Контрольный раствор готовили аналогичным образом, используя вместо растворов объектов исследования 96% этиловый спирт. Инкубировали в темном месте при комнатной температуре в течение 30 минут и определяли оптическую плотность на микропланшетном ридере (TECAN Infinite 200 PRO, Австрия) при $\lambda = 517$ нм. Из оптической плотности образцов вычитали оптическую плотность холостых проб (0,1 мл образца+0,1 мл 96% этилового спирта). Антирадикальную активность (%) по отношению к ДФПГ рассчитывали по формуле:

$$I = ((D_k - (D_o - D_x))/D_k) \times 100, \quad (2.1)$$

где D_k – оптическая плотность контрольного раствора;

D_o – оптическая плотность опытного раствора;

D_x – оптическая плотность холостого раствора.

По полученным данным строили графики зависимости, по которым определяли концентрацию образцов (IC_{50}), ингибирующая 50 % радикалов ДФПГ [131,142,145].

2.8.15 Определение скорости роста

Среднесуточную скорость роста высчитывали по формуле, мм/сут:

$$CCP = r/t \quad , \quad (2.2)$$

где r – радиус колонии, мм;

t – возраст колонии, сут.

2.8.16 Высокоэффективная тонкослойная хроматография

Высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) проводили с помощью автоматизированной системы (САМАГ, Швейцария). Для хроматографии использовали пластины НРТLC silica gel 60, Cat.N 1.05547.0001 (Merck KGaA, Германия), которые перед использованием активировали нагреванием в сушильном шкафу при температуре 120 ± 1 °С в течение 20 мин. Нанесение исследуемых растворов и стандартов на хроматографическую пластину выполняли на автоматическом аппликаторе (Linomat 5 (САМАГ), Швейцария). Разделение соединений проводили в автоматической камере для элюирования (ADC 2 (САМАГ), Швейцария). Линия фронта подвижной фазы составляла 80 мм. Дериватизацию проводили с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия). Работа комплекса и обработка полученных результатов осуществляется с помощью специализированной компьютерной программы «winCATS, версия 1.4.9» с использованием фильтра Savitsky – Golay 7.

Качественный состав фенольных соединений. Исследуемые растворы этилацетатных экстрактов экзометаболитов наносили в количестве 200 мкг. Стандартные растворы фенольных соединений (1 мг/мл) – пирокатехин, дигидрокверцетин, резорцин и гидрохинон, которые наносили в количестве 2 мкл. Для разделения веществ использовали систему растворителей А и Б. Далее осуществляли обработку пластины парами аммиака [146,147].

Качественный состав липофильных соединений. ВЭТСХ проводили на лабораторном комплексе (САМАГ, Швейцария). Исследуемые растворы этила-

цетатных экстрактов культуральной жидкости наносили в количестве 200 мкг. Стандартные растворы липофильных соединений (1 мг/мл) – ланостерол и ситостерол наносили в количестве 5 мкл. Для разделения веществ использовали систему растворителей В и Г. Далее осуществляли обработку пластины проявителем 5 % раствором хлорида железа в серной кислоте [148].

Системы растворителей, использованные для элюирования:

А – бензол-метанол-уксусная кислота (90:16:1);

Б – этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (20:2:3);

В – петролейный эфир-диэтиловый эфир-уксусная кислота (90:10:1);

Г – петролейный эфир-диэтиловый эфир-уксусная кислота (80:20:1).

2.8.17 Проведение ИК-спектрометрии

Структуру эндопигментов подтверждали с помощью ИК-Фурье спектроскопии в режиме неполного внутреннего отражения на спектрометре (Frontier Perkin Elmer, США) в диапазоне 500–4000 см⁻¹ (разрешение 1 см⁻¹, число сканов 10).

2.8.18 Планирование эксперимента

Планирование эксперимента осуществлялось с применением программы *Statistica 13* с помощью функции экспериментального дизайна, производился расчет Вох-Вейнкен с 3-х уровневymi факторами. В качестве варьируемых факторов выбраны 3 компонента среды, у которых изменяли концентрацию 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 антирадикальная активность экзометаболитовДФПГ IC₅₀, мг/мл (y_1) и количество биомассы, г/л (y_2).

2.8.19 Определение микробиологической чистоты

Определение микробиологической чистоты проводили согласно ОФС.1.2.4.0002.15 [149].

2.8.20 Статическая обработка полученных результатов

Каждый эксперимент и измерение повторялись минимум трижды, и результаты выражались в виде среднего значения плюс-минус стандартное отклонение. Статистический анализ проводился с помощью *Statistica 13*, оснащенной набором инструментов для анализа данных.

ГЛАВА 3 ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ НОВЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ И ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПЛОТНЫХ И ТВЕРДЫХ СРЕДАХ

3.1 Выделение новых штаммов грибов *Daedaleopsis tricolor*, *Rusnosporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*

Природные плодовые тела базидиомицетов *Daedaleopsis tricolor*, *Rusnosporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum* были собраны в смешанном лесу Республики Татарстан и Республики Марий Эл осенью 2019 и 2022 года. Они были идентифицированы на основе морфологических и культурных характеристик с помощью литературы [56,57,150-153]. Выделение новых штаммов грибов проводили традиционным методом согласно схеме, приведенной на рисунке 3.1.

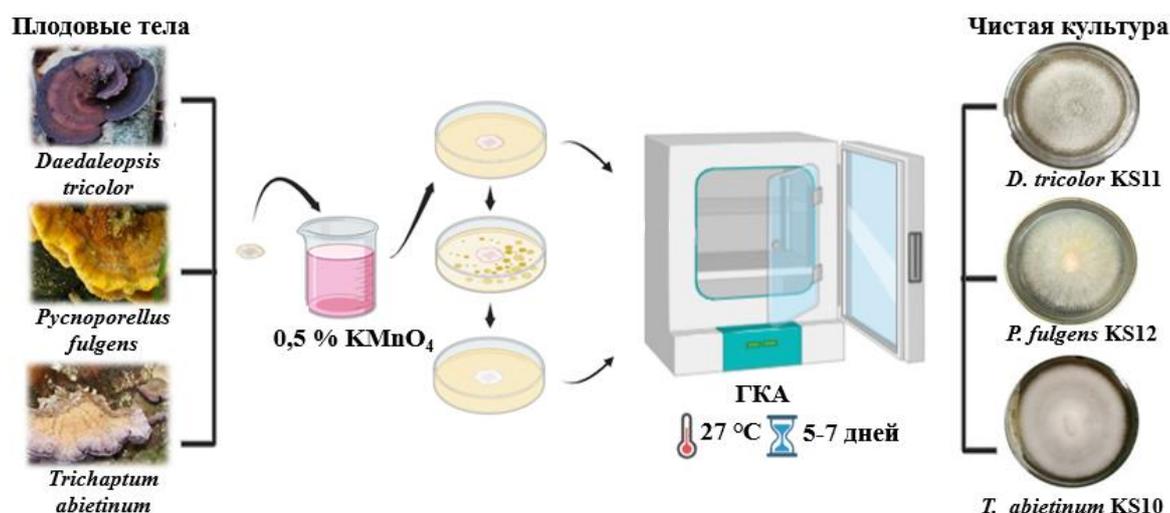


Рисунок 3.1 – Схема выделения новых штаммов грибов *D. tricolor*,
P. fulgens и *T. abietinum*

У выделенных чистых культур изучены макро- и микроморфология. Для *D. tricolor* наблюдается образование войлочной колонии, мицелий рыхлый, белого цвета, с возрастом появляются уплотненные участки с бежево-бурой пигментацией. Вокруг инокулята наблюдается зона наименьшей плотности мицелия диаметром 5 мм. Край колонии ровный, округлый (Приложение А). Мицелий *P. fulgens* хлопковый, неравномерный по плотности, пушистый. Край коло-

нии ровный. Колония окрашена в белый цвет, однако по центру наблюдается пигмент светло-желтого цвета. Реверзум оранжевого цвета (Приложение А). Мицелий гриба *T. abietinum* белого цвета, с оттенком желтого. Штамм образует воздушные колонии, наблюдается концентрическая зональность. Край колонии ровный (Приложение А). У всех выделенных культур приятный, грибной запах.

Согласно микроскопическим исследованиям (рис. 3.2а) гифы *D. tricolor* ветвящиеся, тонкостенные, присутствуют пряжки. Воздушный мицелий *P. fulgens* образуется септированными, толсто- и тонкостенными гифами, без пряжек (рис. 3.2б). Гифы *T. abietinum* септированы, толсто- и тонкостенные с пряжками (рис. 3.2в). Описанные характеристики колоний, мицелия и исследования микроскопии соответствуют данным, приведенным в литературных источниках [154] и являются характерными для данных грибов.

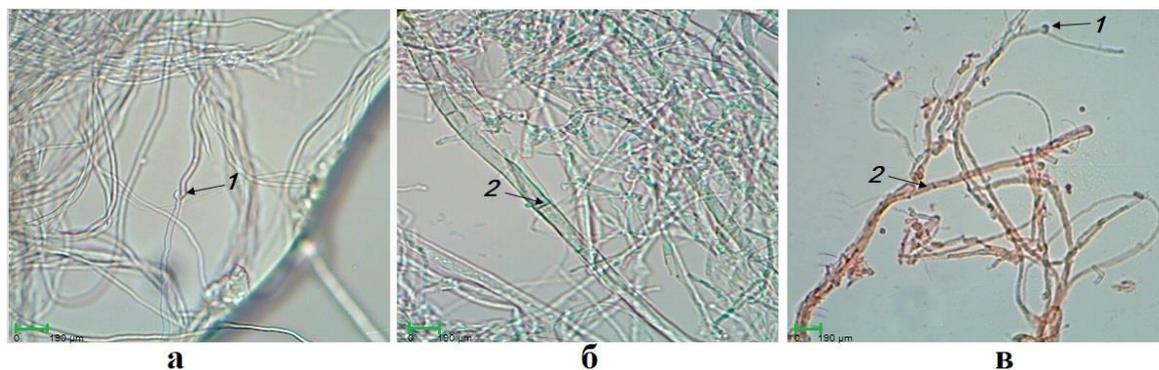


Рисунок 3.2 – Микроскопические снимки мицелия грибов при увеличении $\times 400$: а) *D. tricolor*; б) *P. fulgens*; в) *T. abietinum* (1 – пряжка, 2 – септа)

Морфология различных штаммов *D. tricolor* и *T. abietinum* описана в литературных источниках [73,154]. Например, учеными из Италии и Испании колонии *T. abietinum*, выращенные на агаризованном солодовом экстракте (2 %) при 25 °С охарактеризованы следующим образом: мицелий воздушный, хлопковый, хлопьевидный, окрашен в белый цвет; гифы тонкостенные септированы, с пряжками и многочисленными короткими ответвлениями; цвет реверса чашки Петри не изменился [154]. Другие авторы описывают мицелий *T. abietinum* как не окрашенный, края колонии прижаты, а *D. tricolor* – воздушный, от белого до

коричневого цвета, края прижаты [73]. Отличия в морфологических признаках культур могут быть связаны с разным местом сбора природных плодовых тел, климата, а также условий их культивирования, что приводит к изменениям их морфологических особенностей.

Для подтверждения морфологической идентификации базидиомицетов проведено секвенирование по методу Сэнгера. С помощью секвенирования подтверждено, что выделенные культуры являются *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*. Для *D. tricolor* получена качественная последовательность из 567 олигонуклеотидов, для *P. fulgens* – из 395, а для *T. abietinum* – из 556 (рис. 3.3).

```

1 ggaaggatca ttaacgagtt ttgaaagggg ttgtagctgg cttccgagg catgtgcagc
61 ccctgctcat tccactctac acctgtgcac ttactgtggg tctcaggcga gcgtcggctc
121 cttcgcggcg tcgtcgttca actgggctca cgttttacta caaactatta aagtatcaga
181 atgtctactg cgaattaacg catttaaata caactttcag caacggatct cttggctctc
241 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat
301 catcgaatct ttgaacgcac cttgcgctcc ttggtattcc gaggagcatg cctgtttgag
361 tgtcatgaaa ttctcaacct aacgagctct tgcgggctcg gtaggcttgg acttggaggt
421 tcttgtcggc ctaacggctc gtcctctta aatgcattag ctcggttcct tgcggatcgg
481 ctacacgggt gataattgtc tacgccgca ccggtgaagc gttttggccg gcttctaact
541 gtctcgttgg agacactact ctttatg
a
1 tacgcaataa atacaacttt cagcaacgga tctcttggct ctgcatcga tgaagaacgc
61 agcgaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcga tctttgaacg
121 caccttgac gctccgggat tccgaagcgt atgcctgttt gtagtgcgtg gcatcatcaa
181 acctcactgt ttctgacggt gacggtttgg aattggaggt gttgctgtgg ccttcttgg
241 gcttccggc cctctcaaat gcattagctg ggacgtttgg tccgtaggct ctgacgtgat
301 agtgatggtg cgtcgtggtc caccctcct gtcgccgctt ctaatcgcc agaaggaca
361 gcttaccat tgaccttga cctcaaatca ggtag
б
1 ctgccagtag tcatatgctt gtctcaaaga ttaagccatg catgtctaag tataaacaag
61 tttgtactgt gaaactgcga atggctcatt aaatcagtta tagttattt gatggtgctt
121 tactacatgg ataactgtgg taattctaga gctaatacat gcaatcaagc cccgacttct
181 ggaaggggtg tatttattag ataaaaaac aacgcggttc gccgctcct tggtgattca
241 taataacttc tcgaatcga tggccttgtg ccggcgatgc ttcatc aaa tatctgccct
301 atcaactttc gatgtagga tagaggccta ccatggttc aacgggtaac ggggaataag
361 ggttcgattc cggagaggga gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc
421 gcgcaatta cccaatccc acacggggag gtagtgacaa taaataaca tatagggctc
481 tttcgggtct tataattgga atgagtaca ttaaatctc ttaacgagga acaattggag
541 ggcaagtctg gtgcca
B

```

Рисунок 3.3 – Олигонуклеотидные последовательности: а) *D. tricolor*; б) *P. fulgens*; в) *T. abietinum*

С помощью программного пакета BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) установлено сходство сиквенса выделенных куль-

тур более чем на 99 % со штаммами *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*, зарегистрированных в базе данных GenBank (Приложения Б-Г).

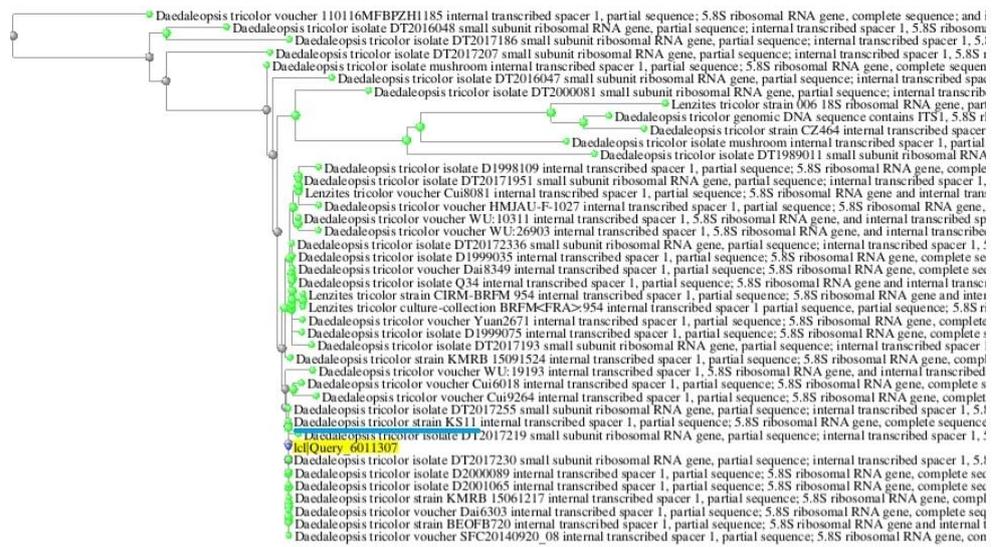
При анализе филогенетического дерева *D. tricolor* представлен 41 штаммом (рис. 3.4) и выделенный новый штамм KS11 расположен далеко от его корневого участка. Наиболее близким к нему является штамм DT2017255. При анализе филогенетического дерева *P. fulgens* установлено, что новый штамм KS12 находится близко к корневому участку дерева, включающего 31 штамм. Культуры *P. fulgens* LE F-342468 и CIRM-BRFM 3593 являются наиболее близкими к нему (рис. 3.4). Филогенетическое дерево *T. abietinum* представлено всего 7 штаммами. Выделенный штамм KS10 *T. abietinum* находится практически в корне дерева и наиболее близким к нему является штамм 4-F7 (рис. 3.4).

Расположение новых штаммов грибов в филогенетическом дереве позволяет провести сравнение их свойства с остальными и близлежащими штаммами, в частности по биосинтезу БАВ, однако такой информации в литературных источниках недостаточно.

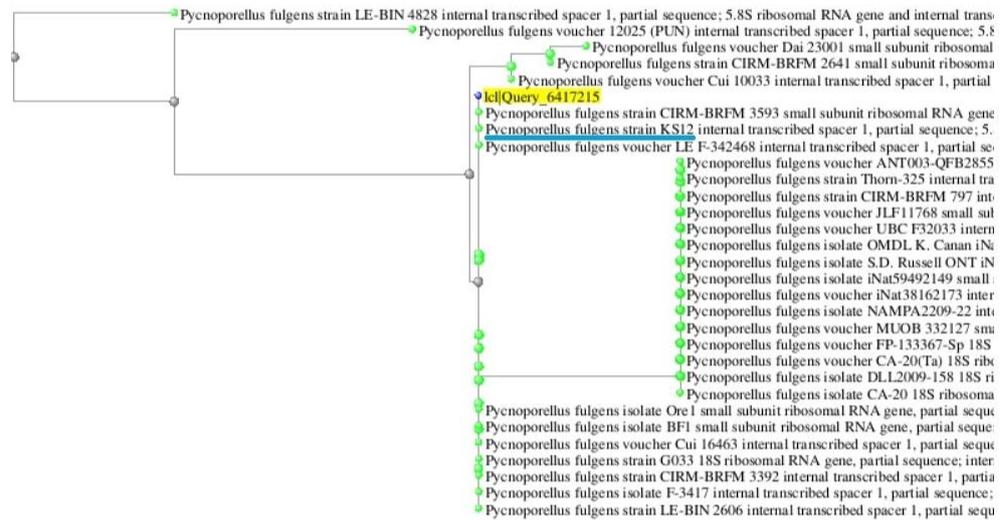
Культуры депонированы в базу данных GenBank Overview. Географические сведения, присвоенные регистрационные номера и штаммы грибов представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Выделенные новые штаммы грибов, географические данные и присвоенные им номера GenBank

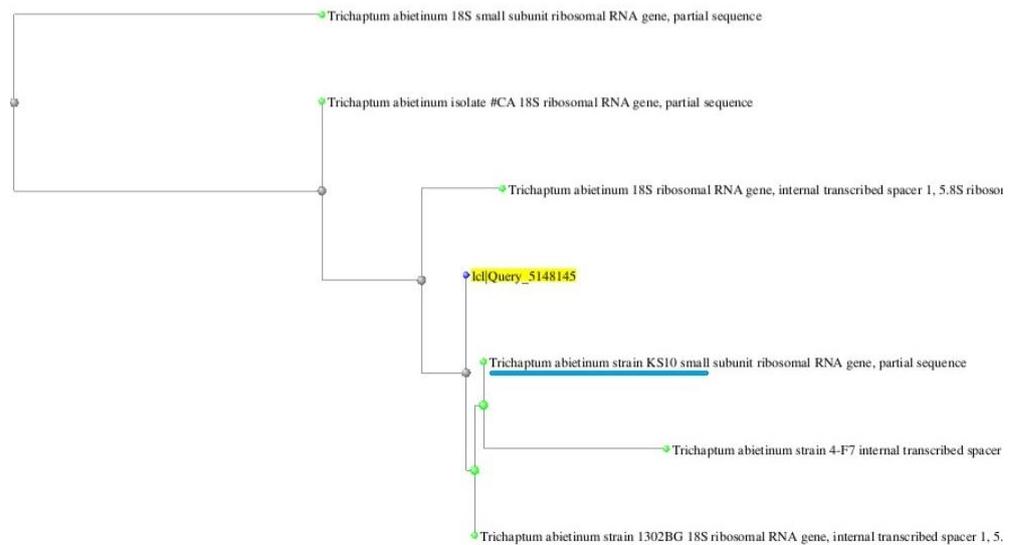
Гриб	Штамм	Год сбора	Место сбора	Депонирован, год	Номер GenBank
<i>D. tricolor</i>	KS11	2022	Республика Татарстан (55°57'17" с.ш. и 49°09'04" в.д.)	2023	OR804093
<i>P. fulgens</i>	KS12	2022	Республика Татарстан (55°57'17" с.ш. и 49°09'04" в.д.)	2023	OR805526
<i>T. abietinum</i>	KS10	2019	Республика Марий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



a



б



в

Рисунок 3.4 – Филогенетическое древо:
 а) *D. tricolor*; б) *P. fulgens*; в) *T. abietinum*

Полученные результаты исследования макро- и микроморфологии, секвенирования выделенных колоний подтверждают, что они являются штаммами грибов *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*. Новые штаммы были зарегистрированы в базе данных Genbank Overview под номерами OR804093 (*D. tricolor* KS11), OR805526 (*P. fulgens* KS12) и OR610852 (*T. abietinum* KS10) [129].

3.2 Подбор условий культивирования на плотных средах базидиомицетов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10

Интенсивность роста грибов, накопление биомассы, метаболизм и секретируемые БАВ зависят от условий их культивирования. Известно, что для выращивания базидиомицетов зачастую используют среды на основе отвара овса, картофеля, солодового экстракта, а также промышленные такие как, Чапека и его модификации [48,76,155]. Однако наиболее популярными и универсальными являются синтетические среды, состав которых разнообразен по источникам питания. В качестве источника углерода в основном добавляют легкоусвояемые сахара – глюкозу, сахарозу, маннозу, лактозу в различных концентрациях. Наиболее предпочтительным азотсодержащим субстратом для выращивания высших грибов является органический азот, например, пептон, дрожжевой экстракт, соевая и кукурузная мука и др. В качестве источника неорганического азота используют нитраты калия, сульфат аммония и т.д. [91,156,157].

На основании литературных данных выбраны следующие среды: глюкозо-картофельная в качестве контрольной, поскольку на данной среде были выделены новые штаммы грибов и хранятся их музейные культуры.

Среды Сабуро и Чапека являются стандартными средами для выращивания грибов. Их состав отличается по источникам углерода и азота. Среда Сабуро содержит наибольшее количество глюкозы и источников азота, культивирование на данной среде может показать, как культура будет расти на среде с избыточным количеством питательных компонентов. В составе среды Чапека входит другой углеродсодержащий субстрат – сахароза и неорганическая фор-

ма азота. Источником азота в составе глюкозо-пептонной среды является пептон. Синтетические среды отличаются друг от друга тем, что вторая синтетическая среда содержит энтегнин, что позволит установить потребность базидиальных культур в этом соединении как элементе питания, либо стимуляторе метаболических процессов, или роста гриба. Выбранный состав питательных сред поможет установить оптимальный источник углерода и азота для каждой культуры гриба.

Рост исследуемых культур на плотных средах определен по ростовым характеристикам, таким как скорость радиального роста и накопление биомассы. На рисунке 3.5 представлен радиус 6-дневных колоний *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на плотных питательных средах.

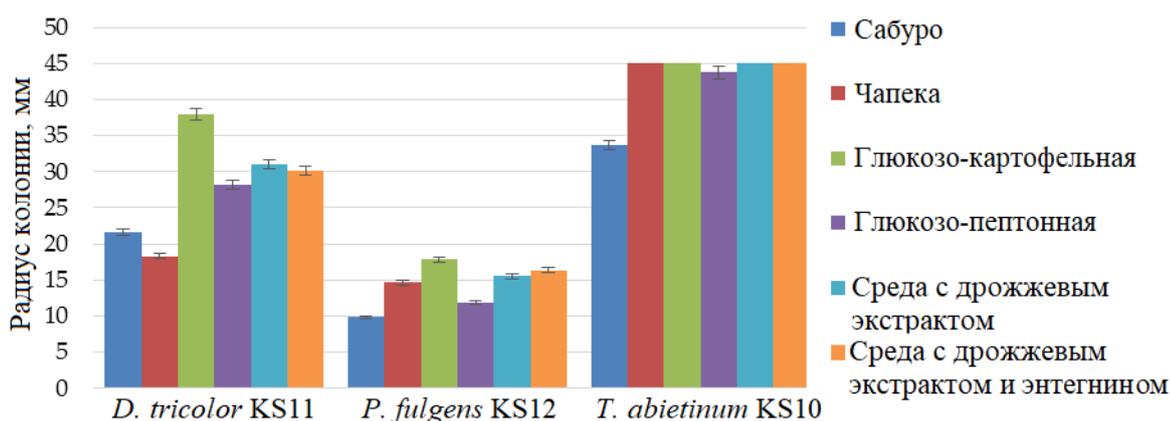


Рисунок 3.5 – Радиус 6-дневных колоний *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на плотных питательных средах (n=5)

Согласно полученным результатам (рис. 3.5) все изученные базидиомицеты хорошо растут на глюкозно-картофельной среде. Наибольший радиальный рост к 6-му дню культивирования наблюдается у *T. abietinum* KS10 практически на всех агаровых средах, за исключением среды Сабуро. Можно предположить, что медленный рост культуры на среде Сабуро связан с высоким содержанием в ней глюкозы (40 г/л), а также с избытком органических источников азота (12 г/л). В литературе есть сведения о скорости роста гриба *T. abietinum* штамма 0110, культивируемом на агарово-солодовом экстракте, которая составляет 5,8

мм/сут [76], а *T. abietinum* регистрационный номер Genbank OR336290 – почти 2 мм/сут [154]. Это меньше, чем у *T. abietinum* KS10, скорость роста которого на средах глюкозо-картофельной, с дрожжевым экстрактом, с дрожжевым экстрактом и энтегнином, Чапека достигала 7,5 мм/сут.

Интенсивный рост (6,32 мм/сут) *D. tricolor* KS11 наблюдается на картофельном глюкозном агаре (рис. 3.5). Аналогичные данные (7 ± 2 мм/сут) о скорости роста этого гриба на агаризованной среде с солодовым экстрактом были представлены в работе [73]. Медленный рост *D. tricolor* KS11 установлен на среде Чапека, где в качестве источника углерода выступает сахароза. Возможно у данной культуры базидиомицета отсутствует фермент β -гликозидаза или он малоактивен, что приводит к замедлению роста на этой среде.

Максимальный радиальный рост ($17,88\pm 0,45$ мм, 3,75 мм/сут) колонии *P. fulgens* KS12 достигается на картофельном глюкозном агаре (рис. 3.5), а минимальный ($9,88\pm 0,2$ мм, 0,43 мм/сут) – на среде Сабуро. Как было сказано ранее, ингибирование роста на этой твердой питательной среде происходит из-за избытка углеродсодержащих и азотсодержащих субстратов. Полученные результаты согласуются с литературными данными [158], где скорость роста *P. fulgens* на агаризованном солодовом экстракте была указана как средняя (полное зарастание чашки Петри за 2-3 недели и более).

Для разработки технологии культивирования грибов необходимо учитывать не только скорость роста культуры, но и накопление ею биомассы. Поэтому было определено количество мицелия, накопленного исследуемыми базидиомицетами, при их культивировании на различных плотных питательных средах. Результаты представлены в таблице 3.2.

При культивировании базидиальных грибов *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 на среде Сабуро, они накапливают наибольшее количество биомассы ($168,67\pm 9,87$ мг на 13-е сутки и $235,50\pm 34,65$ мг на 9-е сутки соответственно), но за более продолжительное время по сравнению с остальными средами. Интенсивное накопление мицелия данных базидиомицетов наблюдается также на среде с дрожжевым экстрактом, при этом у *T. abietinum* KS10 его в 1,4

раза больше и продолжительность культивирования на 3 дня короче (204,67±22,50 на 6-е сутки), по сравнению с *D. tricolor* KS11 (125,00±24,58 мг на 9-е сутки).

Таблица 3.2 – Количество мицелия *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 на разных плотных питательных средах на конец культивирования (сутки) при 27 °С (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 ²		мг	мг/см ²		мг	мг/см ²
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

Наибольшее накопление биомассы *P. fulgens* KS12 за короткое время наблюдается при его выращивании на среде с дрожжевым экстрактом и энтегнином. По-видимому, вещества, содержащиеся в энтегнине, послужили стимуляторами роста для данной культуры. В соответствии со значениями радиальной скорости роста и накопления биомассы исследуемые культуры грибов можно расставить в следующем порядке: *Trichaptum abietinum* KS10 > *Daedaleopsis tricolor* KS11 > *Pycnoporellus fulgens* KS12.

Согласно полученным результатам, выбраны следующие среды для культивирования базидиомицетов: *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 – среда с дрожжевым экстрактом, а *P. fulgens* KS12 – среда с дрожжевым экстрактом и энтегнином, поскольку на данных средах отмечается быстрый рост и накопление большого количества биомассы.

Известно, что метаболизм и рост высших базидиомицетов сильно меняются при изменении температуры. Подбор оптимальной температуры выращивания новых выделенных штаммов грибов проведен на выбранных средах при 15 °С, 24 °С, 27 °С и 37 °С. Радиус колоний *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и

T. abietinum KS10 на 6-е сутки культивирования представлены на рис. 3.6. Согласно полученным данным, оптимальной температурой выращивания для всех исследуемых культур является 27 °С, 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 °С ингибирует рост культур. Результаты определения радиальной скорости роста коррелируют с результатами определения количества биомассы при проведении культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 в разных температурных режимах (табл. 3.3).

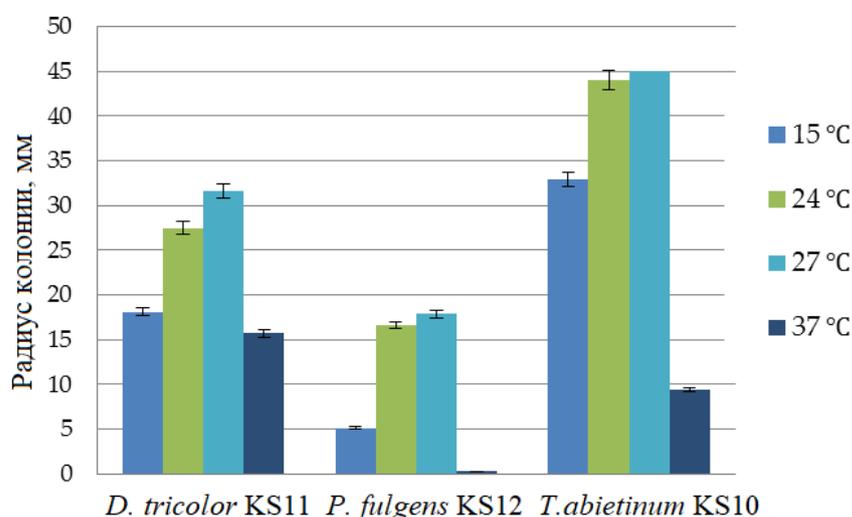


Рисунок 3.6 – Радиус 6-дневных колоний при культивировании на плотной среде с дрожжевым экстрактом (*D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10) и среде с дрожжевым экстрактом и энтегнином (*P. fulgens* KS12) при разных температурах (n=5)

Оптимальная температура роста, выбранная исходя из величины радиального роста (рис. 3.6) и количества накопленной биомассы (табл. 3.3) для всех изученных штаммов, составила 27 °С, что согласуется с литературными данными. Все изученные базидиомицеты растут при температуре около 25 ± 2 °С [62,73,76,86,158]. Таким образом, при оптимальной температуре культивирования, на выбранных питательных средах, для каждого гриба количество биомассы

составило для *D. tricolor* KS11 – 133,25±8,66 мг на 9-е сутки, *P. fulgens* KS12 – 86,73±11,01 мг на 16-е сутки, а *T. abietinum* KS10 – 227,33±36,53 мг на 6-е сутки.

Таблица 3.3 – 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 ²		мг	мг/см ²		мг	мг/см ²
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

Рост базидиальных грибов в течение более длительных периодов времени, вплоть до зарастания всей поверхности чашки Петри наблюдали путем высева инокулята на край чашки. Такой способ выращивания позволяет более детально описать морфологические особенности колоний, их характеристики и рост. Культивирование всех исследуемых базидиомицетов проводили при температуре 27 °C, *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 выращивали на синтетической среде с дрожжевым экстрактом, а *P. fulgens* KS12 на синтетической среде с дрожжевым экстрактом и энтегнином. Продолжительность роста *D. tricolor* KS11 при таком расположении инокулята составила 11 суток, *P. fulgens* KS12 – 17 суток и *T. abietinum* KS10 – 9 суток. Колонии *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 приведены на рис. 3.7.

Гриб *D. tricolor* KS11 образует бархатистый тип колонии, мицелий плотный, с длинными спутанными гифами. Окраска колонии белая на протяжении первых 4-х суток культивирования, на 5 сутки колония приобретает коричнево-серый пигмент, при этом край колонии остается белым. Край колонии равномерный. Наблюдается выраженный грибной запах (рис. 3.7а). Цвет колонии *P. fulgens* KS12 желтый, охристый, оранжевый, местами белый. Воздушный мицелий растет в виде рыхлой паутинистой пленки, с длинными спутанными гифами. Край колонии неровный, пигмент распространен неравномерно (рис. 3.7б). Базидиомицет *T. abietinum* KS10 образует воздушные, войлочные коло-

нии белого цвета. Гифы короткие, невысокие. Край ровный. Наблюдается концентрическая зональность (рис. 3.7в), ярко выраженный грибной запах.

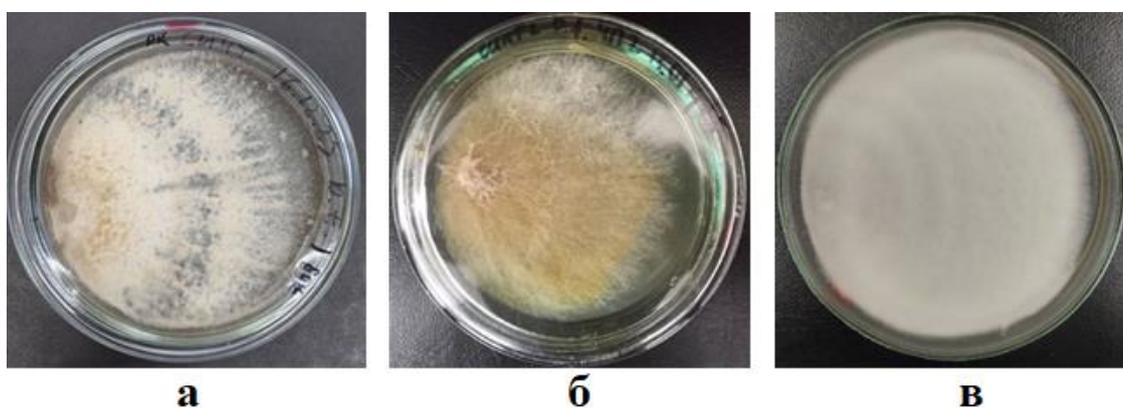


Рисунок 3.7 – Колонии выделенных штаммов грибов, посеянные на край чашки

Петри на конец культивирования:

а) *D. tricolor* KS11 (11-е сутки); б) *P. fulgens* KS12 (17-е сутки);

в) *T. abietinum* KS10 (9-е сутки)

У колонии *D. tricolor* KS11, выращенной данным способом более отчетливо выражена зональность и лучеобразный рост гиф, а также расположение пигмента, по сравнению со стандартным расположением высечки инокулята. Рост мицелия на поверхности агаризованной питательной среды ксилотрофов *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 не сильно отличается при применении 2 способов культивирования. При выращивании инокуляционного блока гриба *T. abietinum* KS10 с краю чашки Петри отмечается наименьшее время зарастания поверхности питательной среды, что подтверждает его быструю скорость роста.

Таким образом, согласно полученным результатам радиального роста и накопления биомассы можно сделать вывод, что оптимальной плотной питательной средой для выращивания грибов *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 является среда с дрожжевым экстрактом, а *P. fulgens* KS12 – среда с дрожжевым экстрактом и энтегнином при температуре 27 °С. При таких условиях у них отмечается быстрый рост и наибольшее количество биомассы. *T. abietinum* KS10 является продуктивным и быстрорастущим штаммом, поскольку его вре-

мя выращивания на агаризованной синтетической среде с дрожжевым экстрактом составляет 6 суток, что на 3 и 10 дней меньше по сравнению с продолжительностью культивирования *D. tricolor* KS11 на этой же среде и *P. fulgens* KS12 на синтетической среде с дрожжевым экстрактом и энтегнином. Количество накапливаемого мицелия *T. abietinum* KS10 к концу культивирования ($227,33 \pm 36,53$ мг) в 1,7 и 2,6 раза больше по сравнению с *D. tricolor* KS11 и *P. fulgens* KS12.

3.3 Культивирование *T. abietinum* KS10 на твердых средах

Биокомпозитные материалы на основе мицелия дереворазрушающих грибов возможно получить при их культивировании на твердых органических субстратах. Среди исследуемых культур, *T. abietinum* KS10 показал наибольшую скорость роста, также он обладает высокой лигнолитической активностью [76]. В связи с этим, он был выбран для разработки композитных биоразлагаемых материалов на основе шелухи семян подсолнечника. Для выращивания базидиомицетов шелуха семян подсолнечника не является полноценной питательной средой, чтобы она удовлетворяла потребности гриба в питательных веществах, необходимо внести дополнительно добавки. Согласно литературным данным, при культивировании грибов на шелухе семян подсолнечника с добавлением пшеничных отрубей наблюдались хорошие темпы роста. Кроме того, при добавлении в питательную среду измельченной шелухи семян подсолнечника скорость роста культуры значительно увеличивалась [159]. Для того, чтобы определить, как измельчение сырья влияет на рост *T. abietinum* KS10 и структуру получаемого упаковочного композиционного материала, было проведено культивирование на следующих твердых питательных средах: 1) неизмельченная лузга подсолнечника (размер частиц 4-13 мм); 2) измельченная лузга подсолнечника (размер частиц 0,2–0,3 мм); 3) измельченная лузга подсолнечника с добавлением 1 % овсяных отрубей (размер частиц 0,2–0,3 мм). Ро-

стовые характеристики гриба и структура полученного композиционного биоматериала приведены на рисунках 3.8, 3.9, а также таблице 3.4.

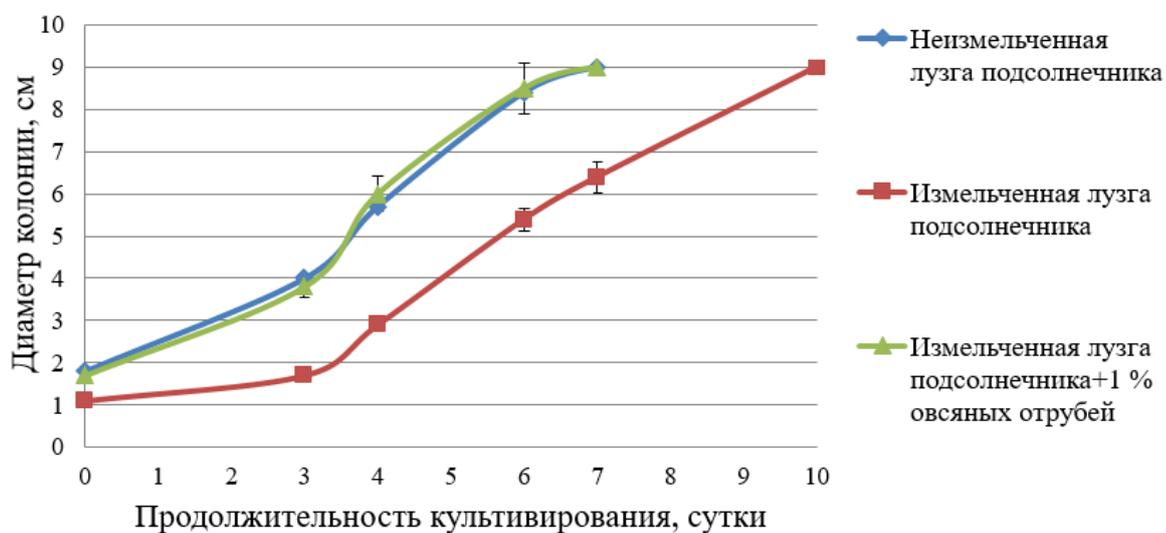


Рисунок 3.8 – Динамика роста *T. abietinum* KS10, культивируемого на лузге семян подсолнечника (n=3)

Высокие темпы роста *T. abietinum* KS10 наблюдались на питательной среде, содержащей измельченную шелуху семян подсолнечника и овсяных отрубей, а также на неизмельченной шелухе семян подсолнечника. Максимальный диаметр колонии (9,0 см) и скорость роста гриба ($5,24 \pm 0,08$ и $5,14 \pm 0,07$ мм/сут) на этих средах достигается на 7-е сутки культивирования. Хотя при культивировании на измельченной среде это значение устанавливалось только к 10-му дню (рис. 3.8, табл. 3.4). Можно предположить, что овсяные отруби, входящие в состав питательной среды, кроме питательных веществ содержат также стимуляторы роста.

Таблица 3.4 – Ростовые показатели мицелия гриба *T. abietinum* KS10 на лузге подсолнечника (n=3)

Питательная среда	ССР, мм/сут	Сутки
Неизмельченная шелуха подсолнечника	$5,14 \pm 0,07$	7
Измельченная шелуха подсолнечника	$3,87 \pm 0,23$	10
Измельченная шелуха подсолнечника+1% овсяные отруби	$5,24 \pm 0,08$	7

В качестве основы для упаковочного материала может быть использована измельченная шелуха семян подсолнечника или измельченная лузга подсолнечника с добавлением 1 % овсяных отрубей. Полученный композиционный материал после культивирования на нем *T. abietinum* KS10 имеет удовлетворительную структуру, близкую к структуре картона. В то время как образец, полученный с использованием неизмельченной шелухи, имеет рыхлую и фракционную структуру (рис. 3.9).



Рисунок 3.9 – Композиционные материалы, полученные при культивировании *T. abietinum* KS10 на шелухе семян подсолнечника:

а) неизмельченной; б) измельченной; в) измельченной с добавлением 1 % овсяных отрубей

Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания композиционных биоматериалов на основе мицелия *T. abietinum* KS10, выращенном на лузге семян подсолнечника. При этом применение данной культуры гриба более перспективно по сравнению с другими, например, *Trametes polyzona* (Pers.) Justo (2011), поскольку продолжительность его культивирования на 3 дня меньше, а структура биокомпозита более похожа на плотный картон [160].

ГЛАВА 4 ПОГРУЖЕННОЕ ЖИДКОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *D. TRICOLOR* KS11, *P. FULGENS* KS12 И *T. ABIETINUM* KS10

Для разработки биотехнологии культивирования базидиальных грибов важным этапом является получение посевного материала, подбор и оптимизация питательной среды. Контролировать качество и выход конечного продукта можно изменяя биотехнологические параметры и состав сред. Для продуктивного роста культуре необходимо обеспечить доступные источники питания, такие как углерод, азот, а также минеральные вещества. Для сокращения себестоимости питательной среды предлагается вместо дрожжевого экстракта вносить другой, более доступный, дополнительный источник белка. Часто в качестве таких добавок при выращивании грибов используют продукты переработки сои и пептон [161-165]. Продукты переработки сои, например, соевая мука и шрот сои, являются богатыми источниками белка. Соевый изолят содержит от 86 до 92 % белка. Его производят из шрота, который остается после экстракции масла из семян сои. Продуктами переработки соевых бобов кроме изолята являются также текстураты. Технология получения данных продуктов отличаются, как и их состав, что может повлиять на доступность питательных веществ. Текстурат соевого белка изготавливают из обезжиренной соевой муки, которую в дальнейшем формируют в виде фарша, шницелей и т.д. В его состав входят до 54 % белков, до 35 % углеводов и до 2 % жиров. Соответственно соевый текстурат является источником не только белков, но и углеводов, также липидов [166]. Дрожжевой экстракт для растущей культуры гриба является как источником белка (содержание до 30 %), пептидов, так и аминокислот, витаминов, минералов, которые необходимы грибу в качестве факторов роста. Пептоны представляют собой белоксодержащий продукт, количество белка в котором достигает 85 %.

4.1 Культивирование *Daedaleopsis tricolor* KS11

Для глубинного культивирования гриба *D. tricolor* согласно литературным данным применяют среды, содержащие моносахарид – глюкозу, или полисахарид – крахмал как источники углерода. В качестве азотсодержащего субстрата используют пептон, дрожжевой экстракт. Также в питательную среду добавляют кукурузный экстракт и соевую муку, которые богаты как белками, так и углеводами. Некоторые авторы используют для культивирования грибов *D. tricolor* среды, в состав которых входят как дрожжевой экстракт, так и пептон [78].

Вначале подбирали продолжительность культивирования посевного материала *D. tricolor* KS11 в течение 5-7 дней при 27 °С на среде с дрожжевым экстрактом. Количество вносимого посевного материала – 10 %. Показано, что оптимальным временем культивирования является 7 суток.

Затем проводили выращивание ксилотрофа *D. tricolor* KS11 на среде с дрожжевым экстрактом, с соевым 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 4.1.

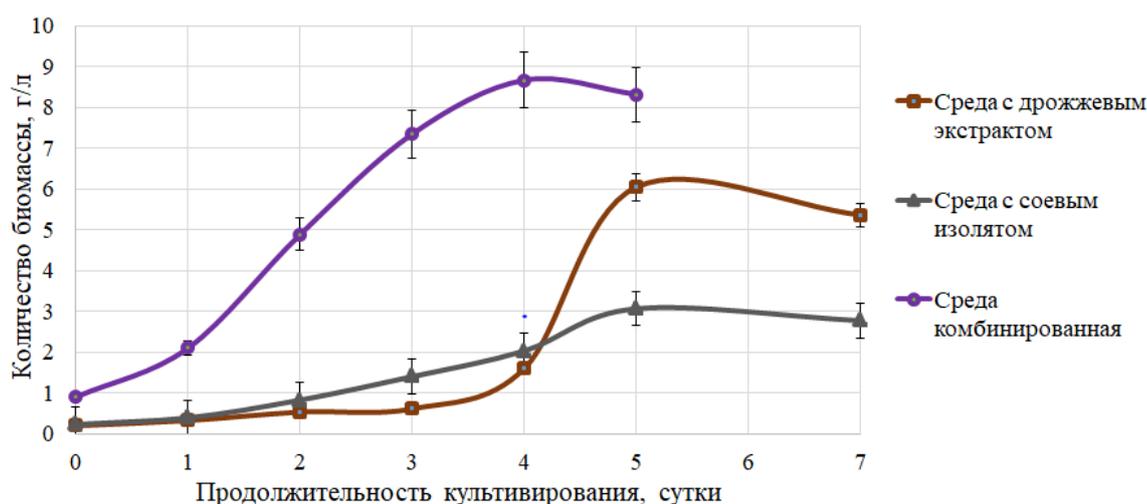


Рисунок 4.1 – Рост биомассы *D. tricolor* KS11 при культивировании на питательных средах с различными источниками азота

На среде с дрожжевым экстрактом наблюдается максимальное накопление биомассы на 5 сутки культивирования ($6,05 \pm 0,33$ г/л) (рис. 4.2). На среде с соевым изолятом наибольшее количество биомассы $3,07 \pm 0,33$ г/л также отмечается на 5 сутки выращивания. Можно предположить, что ингибирование роста мицелия связано с избытком азота в питательной среде, поскольку соевого изолята было внесено 5 г/л, и он содержит до 95 % белка.

Комбинированная среда включает два источника азотсодержащего субстрата – дрожжевой экстракт и соевый изолят в соотношении 1:1. Такой состав позволит снизить избыточное количество белка, при этом сохранить необходимые питательные компоненты для интенсивного роста гриба. При выращивании *D. tricolor* KS11 на комбинированной среде на 4 сутки отмечается максимальное количество биомассы – $8,67 \pm 0,01$ г/л (рис. 4.1). Внесение в среду дрожжевого экстракта и соевого изолята позволило сократить процесс культивирования на 1 сутки и увеличить количество биомассы на 43 %.

Проведенный анализ литературных данных показал, что штаммы Db-14, Db-18 и Dr-17 гриба *D. tricolor* при погруженном культивировании на среде, содержащей пептон и дрожжевой экстракт в концентрации 5 и 2 г/л соответственно, накапливают биомассу в количестве от 5,1 до 7,4 г/л в течение 5-7 суток [78]. Следовательно, базидиомицет *D. tricolor* KS11 является перспективным объектом биотехнологии, поскольку он за 4 суток наращивает до 9 г/л биомассы, что сокращает продолжительность процесса с 5 до 4 дней, и увеличивает концентрацию биомассы практически в 1,5 раза по сравнению со средой, в состав которой входит дрожжевой экстракт.

На всех средах мицелий рос в виде шаровидных пеллет, причем на среде с дрожжевым экстрактом присутствовали единичные пеллеты крупного размера от 7-10 мм в диаметре, остальные же не превышали 2-3 мм в диаметре. На среде с соевым изолятом мицелий также рос в виде крупных и мелких пеллет, однако их размер был меньше – 5 и 1-2 мм в диаметре соответственно. Стоит отметить, что на данной среде культуральная жидкость на 5 сутки культивирования приобретает темно-коричневый оттенок, что говорит о возможном

накоплении в ней пигментов. На комбинированной среде все пеллеты имеют одинаковый размер от 2-4 мм в диаметре, а культуральная жидкость не имеет пигментации до конца культивирования.

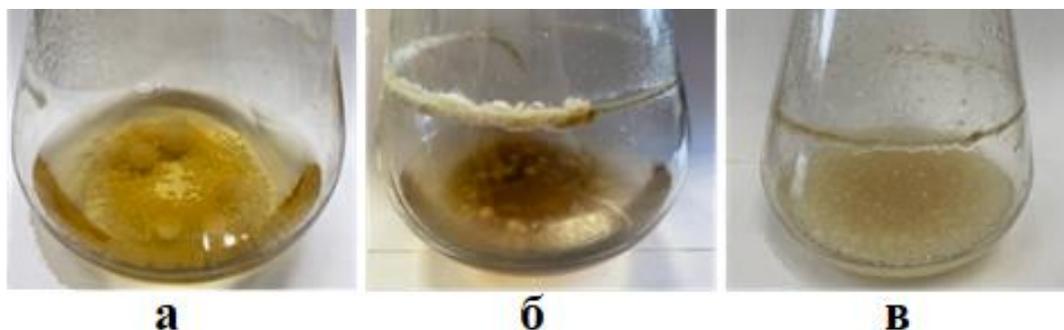


Рисунок 4.2 — *D. tricolor* KS11 на 5 сутки культивирования на средах:
а – с дрожжевым экстрактом; б – с соевым изолятом;
в – комбинированная

На основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что у выделенного нового штамма *D. tricolor* KS11 метаболизм не отличается существенно от метаболизма изученных грибов этого семейства, поскольку потребность в субстрате одинакова. Также данная культура гриба не уступает по ростовым характеристикам известным штаммам.

Для дальнейшей разработки технологии глубинного жидкофазного выращивания гриба *D. tricolor* KS11 проведение основного культивирования следует осуществлять на комбинированной синтетической среде.

4.2 Культивирование *Pycnoporellus fulgens* KS12

Как ранее было показано, *P. fulgens* KS12 хорошо растет на среде, содержащей дрожжевой экстракт и энтегнин. Проведено культивирование данного гриба на средах, отличающиеся источником азотсодержащего субстрата, в качестве которого использованы дрожжевой экстракт и соевый изолят. Энтегнин входит в состав каждой среды. Среда с соевым изолятом больше подходит для

культивирования *P. fulgens* KS12, поскольку концентрация биомассы на данной среде примерно в 2 раза выше, чем на среде с дрожжевым экстрактом ($7,01 \pm 0,14$ и $3,44 \pm 0,23$ г/л). Среда с соевым изолятом больше удовлетворяет потребности гриба в питательных веществах и стимулирует его рост, поскольку содержит кроме достаточного количества азота, больше пептидов малой молекулярной массы, а также свободных аминокислот.

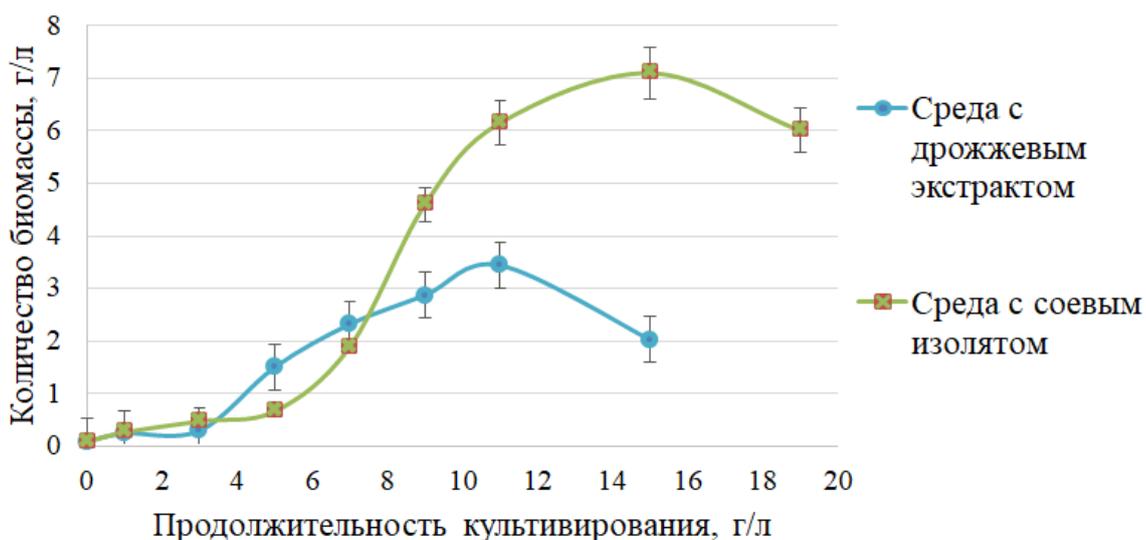


Рисунок 4.3 – Рост биомассы *P. fulgens* KS12 при культивировании на питательных средах с различными источниками азота

В процессе культивирования отмечено накопление пигментов как в культуральной жидкости, так и в биомассе по изменению их цветовой окраски. Пигменты начинали активно накапливаться после 7 суток выращивания. К 15 суткам культивирования 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 (рис. 4.4). Таким образом, возможно, в зависимости от выбранной среды гриб может синтезировать пигменты, отличающиеся по химическому составу. Форма пеллет биомассы *P. fulgens* KS12 отличается. На среде с дрожжевым экстрактом наблюдаются более крупные, шарообразные или немного вытянутые пеллеты, с твердой оболочкой, но полые внутри, а на среде с

соевым изолятом формируются мелкие, практически идеально круглые и однородные шарики, которые легко разрушаются при легком надавливании [131].



Рисунок 4.4 – Культуральная жидкость гриба *P. fulgens* KS12 на 15 сутки культивирования на среде: а – с дрожжевым экстрактом; б – с соевым изолятом

На основании полученных результатов показано, что для погруженного культивирования *P. fulgens* KS12 следует использовать среду с соевым изолятом, так как на ней гриб накапливает в 2 раза больше биомассы по сравнению с его выращиванием на среде с дрожжевым экстрактом.

4.3 Культивирование *Trichaptum abietinum* KS10

Вначале подбирали условия для получения посевного материала *T. abietinum* KS10. Для этого его культивировали на синтетической среде с дрожжевым экстрактом в течение 3 и 5 дней при температуре 27 °С с дальнейшим проведением основного процесса ферментации и определения концентрации накапливаемого мицелия. Количество вносимого посевного материала в обоих случаях составило 10 %. Выявлено, что при сокращении времени выращивания посевного материала, его количество снижается в 6,25 раз, а конечный выход биомассы в 5 раз. Поэтому в последующем посевной материал *T. abietinum* KS10 культивировали в течение 5 суток на синтетической среде с дрожжевым экстрактом [167].

Культивирование *T. abietinum* KS10 проводили на следующих питательных средах: с дрожжевым экстрактом, с соевым изолятом, с соевым текстуратом в виде «фарша» и «шницеля». Динамика роста биомассы приведена на рисунке 4.5.

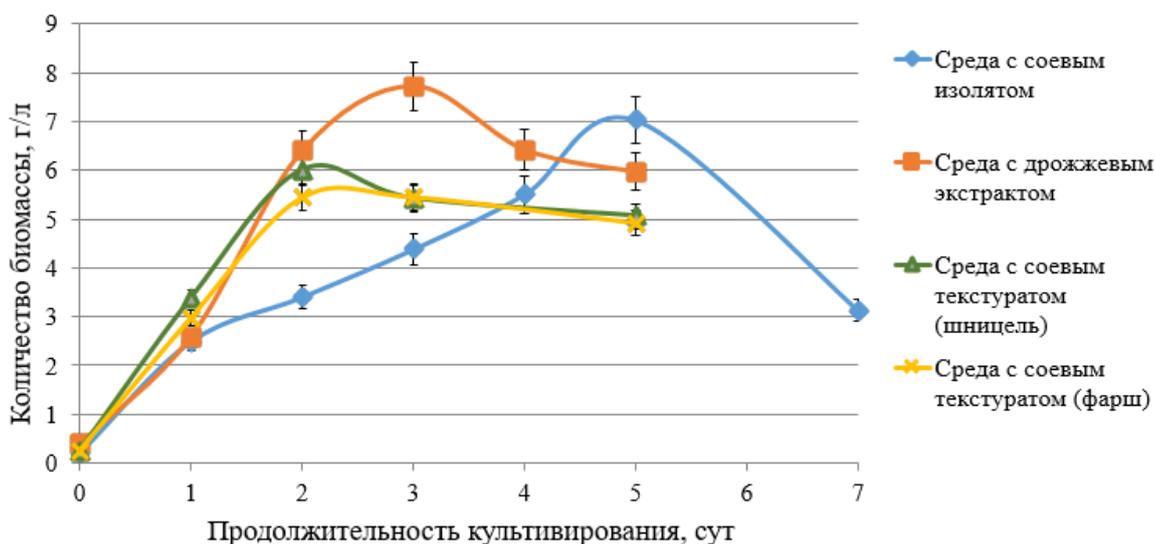


Рисунок 4.5 – Рост биомассы *T. abietinum* KS10 на средах, содержащих разные источники азота

Как видно из представленных данных (рис. 4.5), при культивировании на среде с соевым текстуратом на 2 сутки наблюдается экспоненциальная фаза роста, а на 3 сутки – стационарная, а на среде с дрожжевым экстрактом на 3 и 4 соответственно. По-видимому, именно полисахариды, содержащиеся в сое, способствуют быстрому росту культуры. Не зависимо от вида текстурата («фарш» или «шницель») скорость роста культуры и количество биомассы (5,44 и 6 г/л соответственно) практически не меняется. Резкое падение количества биомассы на среде с соевым изолятом к 7 суткам культивирования может быть связано с тем, что гриб гидролизует белки соевого изолята в процессе жизнедеятельности, в культуральной среде накапливает пептиды с маленькой молекулярной массой, которые после 5 суток культивирования приводят к гибели его клеток. На среде с дрожжевым экстрактом наблюдается наибольшее количество биомассы ($7,72 \pm 0,21$ г/л) к 3 суткам выращивания.

При культивировании гриба *T. abietinum* KS10 на средах с соевым изолятом и текстуратами сформировались круглые пеллеты меньшего размера (диаметр 1-2 мм), чем на среде с дрожжевым экстрактом (диаметр 3-6 мм) (рис. 4.6). Можно предположить, что замена источника азота с дрожжевого экстракта на соевый изолят способствует образованию более мелких пеллет из-за наиболее легкоусвояемых форм азота, которые гриб может быстрее и эффективнее использовать для своего роста и развития.

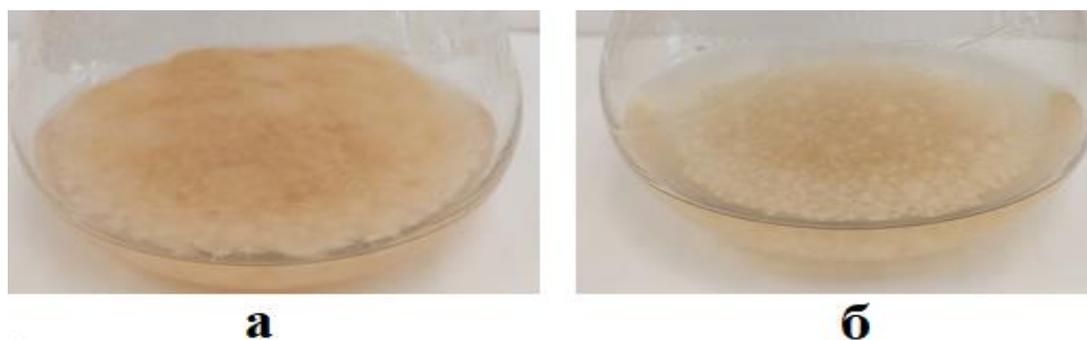


Рисунок 4.6 – *T. abietinum* KS10 на 5 сутки культивирования на средах:
а – с дрожжевым экстрактом; б – с соевым изолятом

Для реализации технологического процесса выгоднее использовать среду с дрожжевым экстрактом, поскольку при культивировании на данной среде грибом *T. abietinum* KS10 происходит интенсивное накопление биомассы ($7,72 \pm 0,21$ г/л) за меньшую продолжительность (3 сут) по сравнению с остальными питательными средами.

По результатам погруженного культивирования для разработки биотехнологий наиболее перспективно выращивать гриб *D. tricolor* KS11 на комбинированной среде, поскольку на ней за более короткое время, за 4 дня, накапливается биомассы на 24 % и 12 % больше по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 соответственно.

4.4 Метаболиты грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10

4.4.1 Физико-химические свойства суммарных экзометаболитов

D. tricolor KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10

С точки зрения дальнейшей разработки биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 важно выявить экзо- и эндометаболиты, обладающие антиоксидантными свойствами. Для этого были определены антиоксидантная активность экзометаболитов и содержание в них простых фенолов (табл. 4.1), а также антиоксидантная активность пигментов, выделенных из биомассы при культивировании грибов на разных питательных средах и в разные фазы роста (табл. 4.2).

Таблица 4.1 – Содержание фенолов и антиоксидантная активность экзометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при погруженном культивировании на разных питательных средах (n=3)

Гриб	Питательная среда	Сут	Содержание фенолов, мг/г	Антиоксидантная активность		
				Фосфолибдено- вый метод, мг/г	Фенантро- линовый метод, мг/г	ДФПГ, мг/мл (IC ₅₀)
<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 изо- лятом	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
	Комбинирован- ная	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 изо- лятом	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 изо- лятом	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

Доказательством изменения метаболического процесса при смене внесимого в питательную среду азотсодержащего субстрата является отличия в накоплении и антиоксидантной активности суммарных экзометаболитов у каждой культуры гриба. В процессе своей жизнедеятельности они секретируют

разные соединения, обладающие отличающимися антиоксидантными свойствами. Показано, что количество простых фенолов к 5 суткам выращивания *D. tricolor* KS11 увеличивается на средах с дрожжевым экстрактом и комбинированной в 5 и 8,6 раз соответственно, а на среде с соевым изолятом снижается в 1,6 раз. При переходе на стационарную фазу роста антиоксидантная (фосфомолибденовый метод) и антирадикальная (ДФПГ) активности экзометаболитов на всех средах увеличивается, что также связано с накоплением отличающихся по химической природе веществ, обладающих этими свойствами. Максимальные значения антиоксидантных (фосфомолибденовый метод) и антирадикальных (ДФПГ) свойств (88,61 мг/г и 3,41 мг/мл) экзометаболитов, а также высокое содержание в них простых фенолов (3,36 мг/г) наблюдается при культивировании *D. tricolor* KS11 на комбинированной среде.

При выращивании *P. fulgens* KS12 на средах с дрожжевым экстрактом и соевым изолятом значимых отличий в антирадикальной активности (ДФПГ) суммарных экзометаболитов и количестве простых фенолов в них не обнаружено. Однако наибольшие антиоксидантные свойства 232,29 мг/г (фосфомолибденовый метод) установлено у экзометаболитов при культивировании гриба на среде с соевым изолятом, что в 1,5 раз больше по сравнению экзометаболитами при использовании среды с дрожжевым экстрактом (табл. 4.1).

На конец культивирования *T. abietinum* KS10 экзометаболиты (среда с соевым изолятом) обладают антиоксидантной (фосфомолибденовый метод) и антирадикальной (ДФПГ) активностью в 1,4 раза большей по сравнению с экзометаболитами (среда с дрожжевым экстрактом) (табл. 4.1). Выращивание *T. abietinum* KS10 на среде с соевым изолятом перспективно для получения продукта на основе его суммарных экзометаболитов с высокими антиоксидантными свойствами.

При проведении погруженного культивирования исследуемых штаммов базидиомицетов на питательных средах с добавлением разного источника белка была замечена тенденция, что с течением времени антирадикальные и антиоксидантные (фосфомолибденовый метод) свойства их суммарных экзометаболитов увеличиваются (табл. 4.1). При этом прямой корреляции с содержанием в

них простых фенолов не выявлено. Можно предположить, что основной вклад в данную активность вносят другие соединения, секретируемые культурами *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. Результаты определения антиоксидантной активности отличаются при использовании разных методов анализа. Фенантролиновый метод показывает близкие результаты антиоксидантных свойств экзометаболитов, а применение фосфомолибденового метода позволяет выявить различия в их свойствах. Это может быть связано с чувствительностью фенантролинового метода. Например, антиоксидант, находящийся в исследуемом объекте, не может реагировать в анализе, если его окислительно-восстановительный потенциал выше, чем окислительно-восстановительный потенциал индикаторной системы, или некоторые антиоксиданты могут быть не способны вступать в реакцию с индикатором из-за пространственных ограничений [168].

К сожалению, не было найдено данных по содержанию фенольных веществ в культуральной жидкости при культивировании гриба *T. abietinum*. Определено их содержание в метанольном экстракте природного гриба *T. abietinum* – 0,26 мг/г (метод Фолин-Чокальтеу) [67]. Содержание фенольных веществ *T. abietinum* KS10 на конец культивирования в 4,5-5 раз выше по сравнению с их содержанием в метанольном экстракте плодового тела гриба, следовательно, перспективно применять экзометаболиты, получаемые путем культивирования *T. abietinum* KS10, чем экстракты из природного гриба.

Общее содержание фенольных веществ в этанольном экстракте, полученном из культивируемого мицелия гриба *D. tricolor* штамм ВЕОФВ 720 составляет $146,37 \pm 4,69$ мкг/г, что в 4,9-27,1 раз ниже по сравнению с культуральными средами *D. tricolor* KS11. Антиоксидантный потенциал по удалению радикаловДФПГ выше в 1,7-2,3 раза у экзометаболитов нового выделенного штамма гриба *D. tricolor* KS11 на конец выращивания, чем у экстракта из мицелия *D. tricolor* штамм ВЕОФВ 720. Базидиомицет *D. tricolor* KS11 является перспективным продуцентом фенолов, поскольку он секретирует большое их количество в культуральную среду, которая обладает высокой антирадикальной активностью по сравнению с известным штаммом *D. tricolor* ВЕОФВ 720 [142].

Таким образом, для погруженного культивирования *D. tricolor* следует применять комбинированную среду, для *P. fulgens* KS12 – среду с соевым изолятом, а для *T. abietinum* KS10 – среду с дрожжевым экстрактом. На данных питательных средах кроме большого накопления грибами биомассы, возможно получить суммарные экзометаболиты, которые содержат простые фенолы, а также обладают высокой общей антиоксидантной и антирадикальной активностями.

В процессе роста *P. fulgens* KS12 в культуральную среду выделяет пигменты, поэтому проведено более детальное изучение состава его экзометаболитов. Осуществлено разделение экзометаболитов культуральных жидкостей экстракцией их гексаном, хлороформом, этанолом, ацетоном и этилацетатом. Содержание пигментов в экстрактах оценивали визуально по окраске. Наиболее интенсивное окрашивание экстрактов было обнаружено при использовании этилацетата, поэтому их использовали для дальнейшего анализа. Антирадикальная активность экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12 на 11 и 15 сутки приведены в таблице 4.2.

Антирадикальная активность экстрактов экзометаболитов 1 и 2 на 15 сутки увеличилась практически в 5 раз, по сравнению с 11 сутками. Максимальные антирадикальные свойства показаны для экстракта 2, которые на 42 % выше, по сравнению с аналогичными свойствами экстракта 1 и аскорбиновой кислоты (табл. 4.2).

Таблица 4.2 – Антирадикальная активность этилацетатных экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12 (n=3)

Показатель	Экстракт 1*		Экстракт 2**		Аскорбиновая кислота
	11 сутки	15 сутки	11 сутки	15 сутки	
IC ₅₀ , мкг/мл	61,73±2,31	12,99±0,51	41,77±1,23	9,18±0,13	12,43±1,24

*- экстракт 1 – этилацетатный экстракт экзометаболитов *P. fulgens* KS12 при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом;

** - экстракт 2 – этилацетатный экстракт экзометаболитов *P. fulgens* KS12 при культивировании на среде с соевым изолятом

Этилацетатный экстракт 2 экзометаболитов гриба *Pycnoporellus fulgens* KS12, обладающий антирадикальными свойствами IC₅₀=9,18±0,13 мкг/мл, пре-

восходит в 9 раз по данной активности этилацетатный экстракт культуральной жидкости *Penicillium flavigenum* CML2965 с $IC_{50}=83,4\pm 2$ мкг/мл [169].

Для определения отличия состава пигментов в этилацетатных экстрактах 1 и 2 применен метод ВЭТСХ. Анализ состава фенолов в экстрактах 1 и 2 проведен с использованием систем растворителей А и Б, а липидов – В и Г. Поскольку в системах А и В наблюдалось лучшее разделение анализируемых веществ, они были применены для проведения ВЭТСХ в автоматизированной системе САМАГ. В качестве стандартов для обнаружения фенольных соединений использованы: 1 – дигидрокверцетин, 2 – резорцин, 3 – гидрохинон, 4 – пирокатехин; липофильных соединений: 5 – ланостерол, 6 – ситостерол. Полученные результаты представлены на рис. 4.7 и сведены в табл. 4. 3.

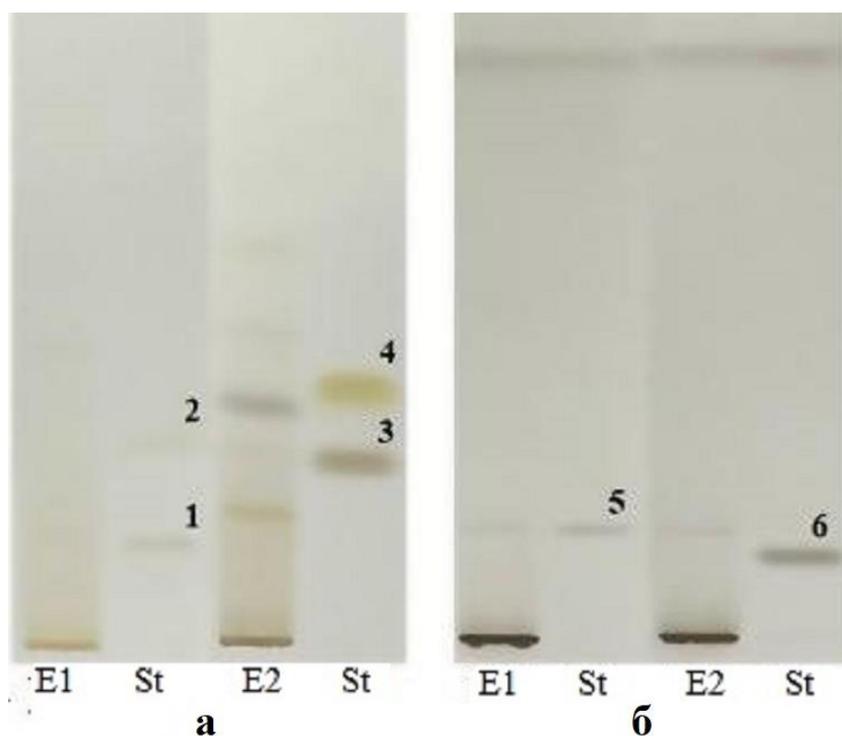


Рисунок 4.7 – Хроматограммы этилацетатных экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12 на 15 сутки культивирования: а) фенольных соединений; б) липофильных соединений.

E1 – экстракт 1, E2 – экстракт 2, St – стандарты

Как показано в табл. 4.3 и на рис. 4.7, экстракты отличаются по количеству обнаруженных фенольных веществ, в экстракте 2 – семь веществ, а в экстракте 1 – четыре вещества.

Таблица 4.3. – ВЭТСХ анализ фенольных и липофильных соединений этилацетатных экстрактов экзометаболитов *P. fulgens* KS12

Фенольные соединения					
Rf _{St}	Стандарт, окрашивание	Экстракт 1		Экстракт 2	
		Rf _E	Идентификация, окрашивание	Rf _E	Идентификация, окрашивание
–	–	0,11	Не идентифицировано, светло-коричневое	0,11	Не идентифицировано, светло-коричневое
0,19	Дигидрокверцетин, серо-желтое	0,18	Дигидрокверцетин, серо-желтое	0,19	Дигидрокверцетин, серо-желтое
–	–	–	–	0,21	Не идентифицировано, желтое
0,31	Гидрохинон, коричневое	0,30	Гидрохинон, коричневое	0,31	Гидрохинон, коричневое
0,36	Резорцин, бежево-розовое	–	–	–	–
–	–	–	–	0,40	Не идентифицировано, светло-серое
0,44	Пирокатехин, желтое	–	–	–	–
–	–	0,51	Не идентифицировано, светло-оранжевое	0,52	Не идентифицировано, светло-оранжевое
–	–	–	–	0,67	Не идентифицировано, светло-розовое
Липофильные соединения					
–	–	–	–	0,09	Не идентифицировано, светло-коричневое
0,14	Ситостерол, серое	0,13	Не идентифицировано, светло-коричневое	0,13	Не идентифицировано, светло-коричневое
0,19	Ланостерол, светло-фиолетовое	0,19	Ланостерол, светло-фиолетовое	0,19	Ланостерол, светло-фиолетовое

В анализируемых объектах с помощью примененных стандартов установлено присутствие гидрохинона и дигидрокверцетина, в них отсутствуют – резорцин и пирокатехин. В обоих экстрактах с применением стандарта обнаружен ланостерол. В экстракте 2 присутствие дополнительного пятна с Rf=0,09 указывает на то, что спектр стероидных веществ в нем шире [131].

4.4.2 Физико-химические свойства эндопигментов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10

Многие грибы являются источником пигментов – меланинов и каротиноидов, которые способны проявлять высокие антиоксидантные свойства. Согласно литературным данным [67,78,170] в экстрактах природных плодовых тел и мицелия *D. tricolor*, *T. abietinum* были обнаружены каротиноиды. Другими авторами [63] был выделен меланин из плодовых тел этого гриба, произрастающего в природе. Приведенные сведения показывают перспективу изучения эндопигментов базидиальных грибов. Эндопигменты из биомассы базидиальных грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 выделены по стандартным методикам получения меланинов, поэтому, проведены качественные реакции на их принадлежность к меланинам. Для этого использованы качественные реакции с перманганатом калия и хлоридом железа (III). При добавлении перманганата калия к растворам эндопигментов они приобрели зелёную окраску, что свидетельствует о положительной реакции на меланин. Положительный результат наблюдался так же при реакции эндопигментов с хлоридом железа (III), выпал коричневый, крупный, хлопьевидный осадок, который при избытке раствора хлорида железа растворяется. На основании полученных результатов, выделенные эндопигменты грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 можно предварительно отнести к меланинам.

Вероятно, при выращивании грибов *D. tricolor* KS11 и *P. fulgens* KS12 на питательной среде с соевым изолятом, они испытывают стресс, в связи с чем синтезируют большое количество эндопигментов. Возможно, из-за недостаточного содержания доступных питательных веществ, они имеют низкую антиоксидантную активность. При выращивании *D. tricolor* KS11 на средах с дрожжевым экстрактом и комбинированной, а *P. fulgens* KS12 – с дрожжевым экстрактом, количество синтезируемых ими эндопигментов снижается, а так как в этом случае в питательной среде присутствует оптимальное соотношение доступных

для гриба питательных веществ, синтезируемые пигменты имеют достаточно высокую антиоксидантную активность (табл. 4.4).

Таблица 4.4 – Результаты определения концентрации эндопигментов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при погруженном культивировании на разных питательных средах и их антиоксидантная активность (n=3)

Гриб	Питательная среда	Сут	Концентрация эндопигмента, мг/г*	Антиоксидантная активность, мг/г	
				Фосфолибденный 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

Обратная корреляция наблюдается для *T. abietinum* KS10. Вероятно, это связано с особенностями его метаболизма. Соевый изолят является для него более доступным азотсодержащим субстратом [171].

Эндопигмент, выделенный из биомассы *D. tricolor* KS11 при его культивировании на среде с соевым изолятом, проанализирован с применением ИК-спектроскопии (рис. 4.8).

ИК-спектр эндопигмента *D. tricolor* KS11 имеет все полосы поглощения характерные для синтетического меланина и меланина сепии [172,173], которые обычно используют в качестве стандартов для идентификации этих пигментов. В спектре эндопигмента *D. tricolor* KS11 проведено отнесение полос поглощения по [172,173].

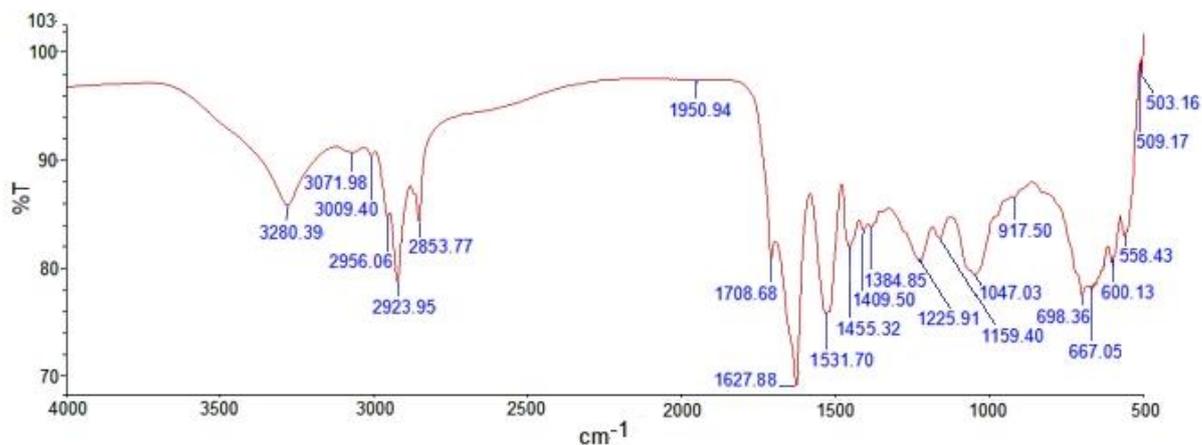


Рисунок 4.8 – ИК-спектр эндопигмента *D. tricolor* KS11
(среда с соевым изолятом)

Полосы поглощения в диапазоне $3600\text{-}2800\text{ см}^{-1}$ связаны с валентными колебаниями (O-H и N-H) аминов, амидов или карбоновых кислот, фенольных и ароматических аминокислот, присутствующих в индольной и пирроловой системах. Характерная сильная полоса при $\sim 1708\text{ см}^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями C=O, а полоса $\sim 1627\text{ см}^{-1}$ колебаниями связей ароматического кольца C=C амида I, или симметричным валентными колебаниями COO-групп. Наличие полос поглощения деформационных колебаний N-H при 1627 см^{-1} (амид II полоса) и валентных колебаний C-N при 1531 см^{-1} (амид II полоса) указывают на то, что пигмент имеет типичную индольную структуру меланина. Полосы в диапазоне $\sim 1400\text{-}1500\text{ см}^{-1}$ относятся к асимметричным деформационным колебаниям алифатических C-N-связей. Полоса при 1409 см^{-1} (CH₂-CH₃ связи) является характерным признаком меланина. Фенольные C-OH плоскостные деформационные колебания, проявляющиеся при 1225 см^{-1} , могут свидетельствовать о присутствии в меланине фенольных соединений. Полоса с центром в 1047 см^{-1} может указывать на присутствие гетероциклов с кислородным гетероатомом, или может характеризовать внеплоскостные деформационные колебания метильной группы γCH_3 (крутильные и веерные) с перекрытием плоскостными деформационными колебаниями $\delta\text{C-N}$ связи (ножничными и маятниковыми СН в плоскости алифатической структуры, которые также является

характерными для пигмента меланина. Полосы ниже 700 см^{-1} могут быть связаны с замещением алкена С-Н в пигменте меланина.

Проведено сравнение спектра эндопигмента *D. tricolor* KS11 со спектрами меланинов, выделенных из других культивируемых грибов. Наиболее близкая картина спектра и наличие аналогичных полос поглощения в спектре эндопигмента *D. tricolor* KS11 наблюдаются со спектрами меланинов грибов: немодифицированного меланина *D. tricolor* [174], *Inonotus hispidus* [175], *Lachnum* УМ404 [176] и ряда др. Отличительной особенностью спектров этих меланинов является высокая интенсивность полос поглощения при 2920 см^{-1} . Поскольку эта и близкие к ней полосы соответствуют колебаниям алифатических С-Н групп, то считают, что в составе этих меланинов имеется высокое содержание алифатических соединений. Кроме того, полосы средней интенсивности при 2853 см^{-1} на правом плече полосы колебаний алкильных С-Н подтверждают присутствие альдегидных групп в меланине. Таким образом, на основании анализа ИК-спектра эндопигмента *D. tricolor* KS11 и проведенных качественных реакций, он может быть отнесен к меланинам. Требуется провести расширенное исследование эндопигментов *D. tricolor* KS11 для того, чтобы отнести их к конкретному виду меланина.

Базидиомицет *D. tricolor* KS11 продуцирует больше эндопигментов (до 126 мг/г) по сравнению с другими исследуемыми культурами. Для дальнейшего создания БАД антиоксидантного действия на основе эндопигментов *D. tricolor* KS11, рекомендуется его культивировать на комбинированной питательной среде, поскольку на ней в биомассе накапливается достаточное количество меланинов с высокими антиоксидантными свойствами.

ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ПО- ГРУЖЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *D. TRICOLOR* KS11

Итоговые результаты, полученные по погруженному культивированию грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – 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:			
- фосфолибденовый 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:			
-фосфолибденовый 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 ₅₀ , мг/мл	3,41±0,22	2,38±0,11	8,06±0,65

На основании проведенных экспериментов, для дальнейшей разработки биотехнологии выбрана культура *D. tricolor* KS11. Это обосновано тем, что при выращивании на комбинированной среде она накапливает больше всего биомассы 8,67 г/л на 4 сутки, простых фенолов 3,36 мг/г на 5 сутки, а ее экзометаболиты обладают наилучшими антирадикальными свойствами IC₅₀=3,41 мг/мл, по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. В связи с этим для осуществления оптимизации состава среды для культивирования *D. tricolor* KS11 в качестве исходной была выбрана комбинированная.

В качестве варьируемых факторов были использованы концентрации компонентов питательной среды – соевый изолят (x_1), дрожжевой экстракт (x_2) и глюкоза (x_3), а выходных параметров – антирадикальная активность (ДФПГ IC_{50}) экзометаболитов (y_1) и количество биомассы (y_2). На основе литературных данных был выбран диапазон вносимых в среду компонентов. Так, для культивирования *D. tricolor* KS11 в питательную среду вносят 2 г/л дрожжевого экстракта, а глюкозы 10 и 30 г/л [91,142]. Проведено погруженное культивирование *D. tricolor* KS11 по составленному плану в течение 4 суток. Планирование эксперимента и полученные данные представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Планирование эксперимента (n=3)

№ опыта	Варьируемые факторы			Выходные параметры	
	Соевый изолят, г/л (x_1)	Дрожжевой экстракт, г/л (x_2)	Глюкоза, г/л (x_3)	ДФПГ экзометаболитов, IC_{50} , мг/мл (y_1)	Количество биомассы, г/л (y_2)
1	2	2	20	4,03±0,37	6,98±0,64
2	3	2	20	0,68±0,05	8,32±0,40
3	2	3	20	2,69±0,30	8,65±0,34
4	3	3	20	2,59±0,37	10,32±0,15
5	2	2,5	10	0,89±0,07	7,52±0,64
6	3	2,5	10	0,44±0,07	6,81±0,66
7	2	2,5	30	1,80±0,14	10,54±0,65
8	3	2,5	30	1,97±0,15	11,16±0,60
9	2,5	2	10	0,88±0,12	6,91±0,25
10	2,5	3	10	0,93±0,17	8,37±0,48
11	2,5	2	30	3,26±0,14	8,44±0,22
12	2,5	3	30	3,82±0,65	12,89±0,96
13	2,5	2,5	20	4,26	9,58
14	2,5	2,5	20	4,17	9,26
15	2,5	2,5	20	4,15	9,3

Анализ антирадикальной активности ДФПГ IC_{50} . При использовании первой модели уравнения программы *Statistica 13* коэффициент регрессии (R^2) равен 0,83, что говорит о том, что эта модель не дает требуемого уровня точности (от 0,97 до 1). Вторая модель уравнения также не дает высокой точности $R^2=0,92$. Поэтому в работе использовали третью модель уравнения с двухсторонними взаимосвязями, при которой $R^2=0,99$. Получено уравнение регрессии

5.1 – зависимость значения IC_{50} (y_1) от концентрации компонентов в питательной среде (x_1, x_2, x_3):

$$y = 111,1883 - 51,3767 \times x_1 + 0,5733 \times x_1^2 - 80,5967 \times x_2 + 14,3533 \times x_2^2 - 1,1396 \times x_3 - 0,0160 \times x_3^2 + 35,3500 \times x_1 \times x_2 - 6,3400 \times x_1 \times x_2^2 - 0,0800 \times x_1^2 \times x_2 + 1,4460 \times x_1 \times x_3 - 0,02830 \times x_1^2 \times x_3 + 0,0255 \times x_2 \times x_3 \quad (5.1)$$

На основании анализа эффектов и диаграммы Парето определено, что все переменные члены уравнения оказывают значительный эффект на антирадикальные свойства экзометаболитов. Переменная x_1 (содержание соевого изолята в среде) в отличие от переменных x_2 и x_3 (содержание дрожжевого экстракта и глюкозы в среде) имеет отрицательное значение, и именно ее увеличение приведет к возрастанию антиоксидантных свойств экзометаболитов (рис. 5.1).

Для значения ДФПГ IC_{50} чем оно меньше, тем выше антирадикальные свойства. В связи с этим, количество вносимой глюкозы (x_3) должно быть наименьшим (10 г/л). Для того, чтобы оценить влияние компонентов среды от их вносимого количества на антирадикальные свойства экзометаболитов одновременно строят поверхность отклика параметра x_1 (соевого изолята) от x_2 (дрожжевого экстракта) при значении x_3 (глюкоза) 10 г/л (рис 5.2).

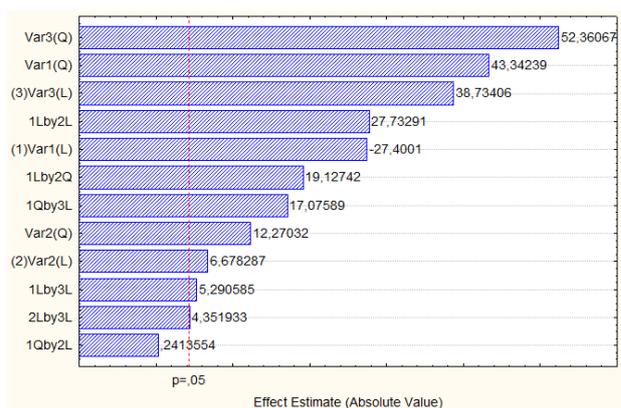


Рисунок 5.1 – Диаграмма Парето (Var1 – соевый изолят, Var2 – дрожжевой экстракт, Var3 – глюкоза)

Как видно из графика поверхности (рис 5.2) наименьшее значение достигается при x_1 (соевый изолят) больше 2,6 г/л. Как было выявлено ранее, при увеличении соевого изолята в среде до 5 г/л накапливается мало биомассы (6 г/л) и антирадикальная активность экзометаболитов снижается (4,56 мг/мл) на 5 сутки культивирования. Следовательно, увеличение его количества в среде не целесообразно.

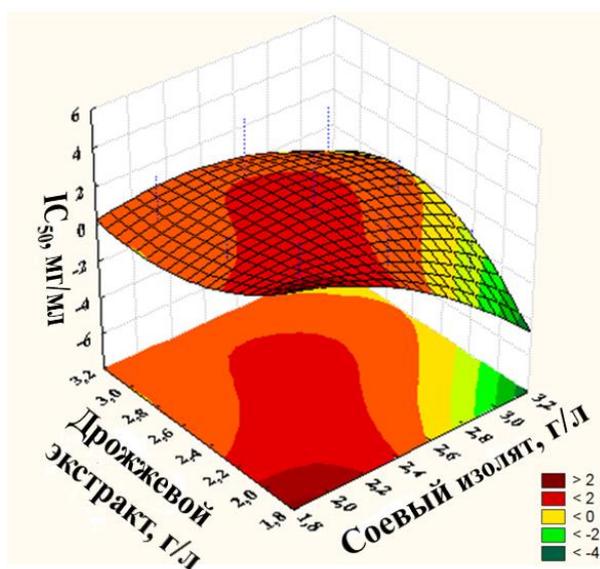


Рисунок 5.2 – График поверхности зависимости IC_{50} при значении параметра x_3 (глюкоза) 10 г/л

На основании графика поверхности (рис. 5.2) выбран следующий состав питательной среды для получения экзометаболитов с максимальными антирадикальными свойствами, г/л: соевый изолят – 3, дрожжевой экстракт – 2, глюкоза – 10. При культивировании *D. tricolor* KS11 на этой среде антирадикальная активность (ДФПГ IC_{50}) экзометаболитов составляет 0,62 мг/мл. Полученный экспериментальный результат близок к расчетному. Это значение в 1,4 раза меньше, чем при использовании оптимальной среды состава, г/л: соевый изолят – 3; дрожжевой экстракт – 2,5; глюкоза – 10. Поэтому, для дальнейшей разработки получения экзометаболитов антиоксидантного действия предлагается использовать данную среду.

Анализ количества биомассы. При использовании первой модели уравнения программы *Statistica 13* коэффициент регрессии (R^2) равен 0,83, а второй – модели 0,92. Поэтому в работе использовали третью модель уравнения с двухсторонними взаимосвязями, при которой $R^2=0,99$. Получено уравнение регрессии 5.2 – зависимость количества биомассы (y_2) от концентрации компонентов в питательной среде (x_1, x_2, x_3):

$$y = -51,3200 + 3,3250 \times x_1 + 6,6450 \times x_1^2 + 55,3150 \times x_2 - 16,8350 \times x_2^2 + 0,3938 \times x_3 + 0,0011 \times x_3^2 - 8,2700 \times x_1 \times x_2 + 6,2000 \times x_1 \times x_2^2 - 4,4800 \times x_1^2 \times x_2 - 0,5935 \times x_1 \times x_3 + 0,1320 \times x_1^2 \times x_3 + 0,1495 \times x_2 \times x_3 \quad (5.2)$$

Как видно по диаграмме Парето (рис. 5.3), все переменные члены уравнения оказывают значительный эффект на накопление *D. tricolor* KS11 биомассы.

Для установления оптимального соотношения параметра x_1 (соевого изолята) и x_2 (дрожжевого экстракта) с целью наилучшего накопления биомассы, необходимо построить графики зависимости x_1 от x_2 при значении x_3 (глюкоза) 10, 20 и 30 г/л (рис 5.4).

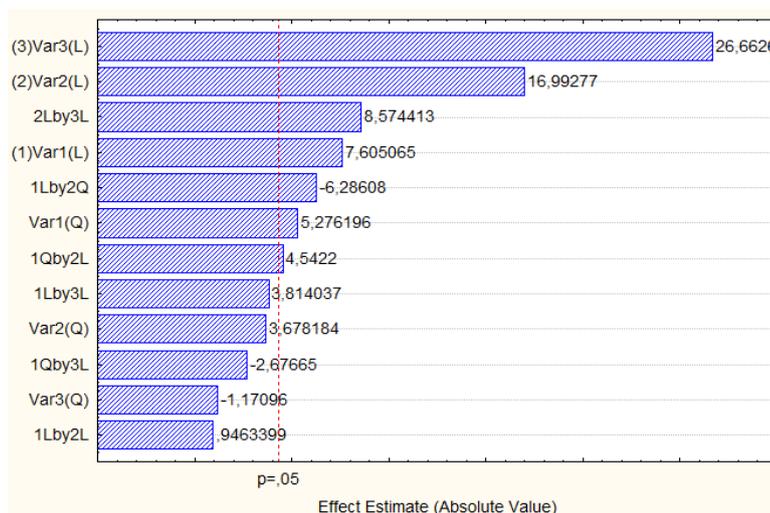


Рисунок 5.3 – Диаграмма Парето (Var1 – соевый изолят, Var2 – дрожжевой экстракт, Var3 – глюкоза)

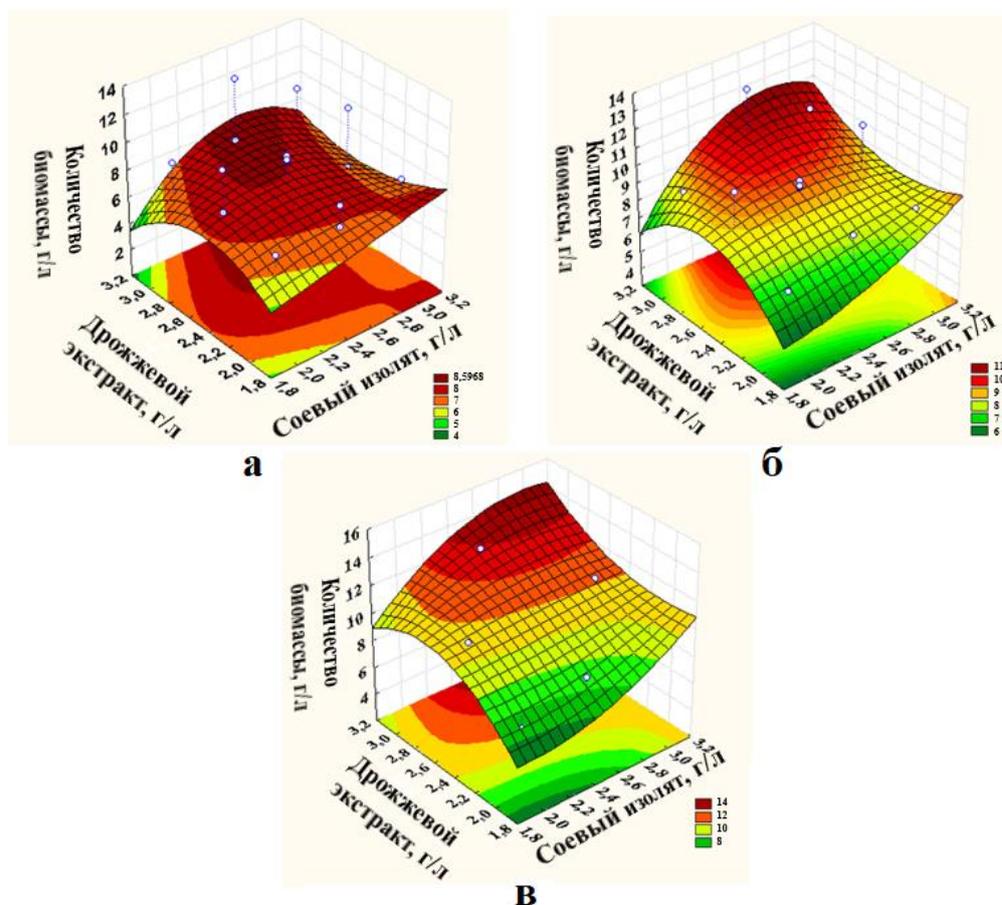


Рисунок 5.4 – График поверхности зависимости количества биомассы при значении параметра x_3 (глюкоза), г/л: а – 10, б – 20, в – 30

Наибольшее количество биомассы наблюдается при концентрации соевого изолята – 2,5 г/л, дрожжевого экстракта – 3 г/л и глюкозы – 30 г/л. Однако при использовании этой среды культуральную жидкость, содержащую экзометаболиты, невозможно высушить до порошкообразного состояния из-за высокого содержания в ней остаточных сахаров. К тому же, антирадикальная активность полученных метаболитов низкая, в среднем IC_{50} больше 2 мг/мл. С технологической точки зрения использование такой среды для получения двух продуктов, биомассы и экзометаболитов с высокими антиоксидантными свойствами, неэффективно. Потому для дальнейшей разработки биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11 выбрана среда следующего состава, г/л: соевый изолят – 3; дрожжевой экстракт – 2,5; глюкоза – 10. При культивировании

D. tricolor KS11 на этой среде, за 4 суток происходит накопление биомассы 6,81 г/л, и антирадикальная активность (ДФПГ IC₅₀) экзометаболитов составляет 0,44 мг/мл.

Проведено сравнение эндопигментов меланиного типа *D. tricolor* KS11, выделенных из мицелия, выращенного на оптимизированной среде, с эндопигментами, выделенными из БАД, содержащими мицелий грибов *Cordyceps* и *Trametes* по количеству и антирадикальной активности (табл. 5.3).

Таблица 5.3 – Количество эндопигментов и их антирадикальная активность в биомассе *D. tricolor* KS11 и пищевых добавках ООО «Компания Хорст» (*Cordyceps*), «NS Organic» (*Trametes*) (n=3)

Объект	Концентрация эндопигмента, мг/г	ДФПГ, IC ₅₀ , 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	-

Показано, что эндопигменты *D. tricolor* KS11 превосходят в 3,5 раза по антирадикальным свойствам эндопигменты, выделенные из пищевых добавок, содержащих мицелий *Cordyceps*. При этом меньшее в 1,5 раза количество эндопигментов *D. tricolor* KS11 обеспечивает более высокую антиоксидантную активность, чем эндопигменты *Cordyceps*. Полученные результаты показывают перспективу разработки конкурентоспособных БАД на основе экзо- и эндометаболитов *D. tricolor* KS11.

5.1 Масштабирование процесса культивирования

Проведено погруженное культивирование *D. tricolor* KS11 в колбах разного объема для доказательства воспроизводства разрабатываемой биотехнологии. Результаты приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Погруженное культивирование *D. tricolor* KS11 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	

Показано, что при увеличении объема колб культура гриба *D. tricolor* KS11 накапливает приблизительно одинаковое количество биомассы на средах, приведенных в таблице 5.4. При этом изменений в образовании пеллет мицелия, свойств культуральной жидкости не наблюдалось. Поэтому можно продолжить масштабирование процесса в больших объемах в ферментерах.

ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *D. TRICOLOR* KS11

6.1 Блок-схема погруженного культивирования *D. tricolor* KS11

На основании полученных результатов для разработки биотехнологии выбран погруженный способ культивирования гриба *D. tricolor* KS11 на оптимизированной комбинированной среде, поскольку он позволяет получить экзо-метаболиты с высокой антирадикальной активностью и практически 7 г/л биомассы в течение 4 суток. Разработана технологическая блок-схема выращивания *D. tricolor* KS11 погруженным способом, представленная на рисунке 6.1. Процесс состоит из 5 стадий.

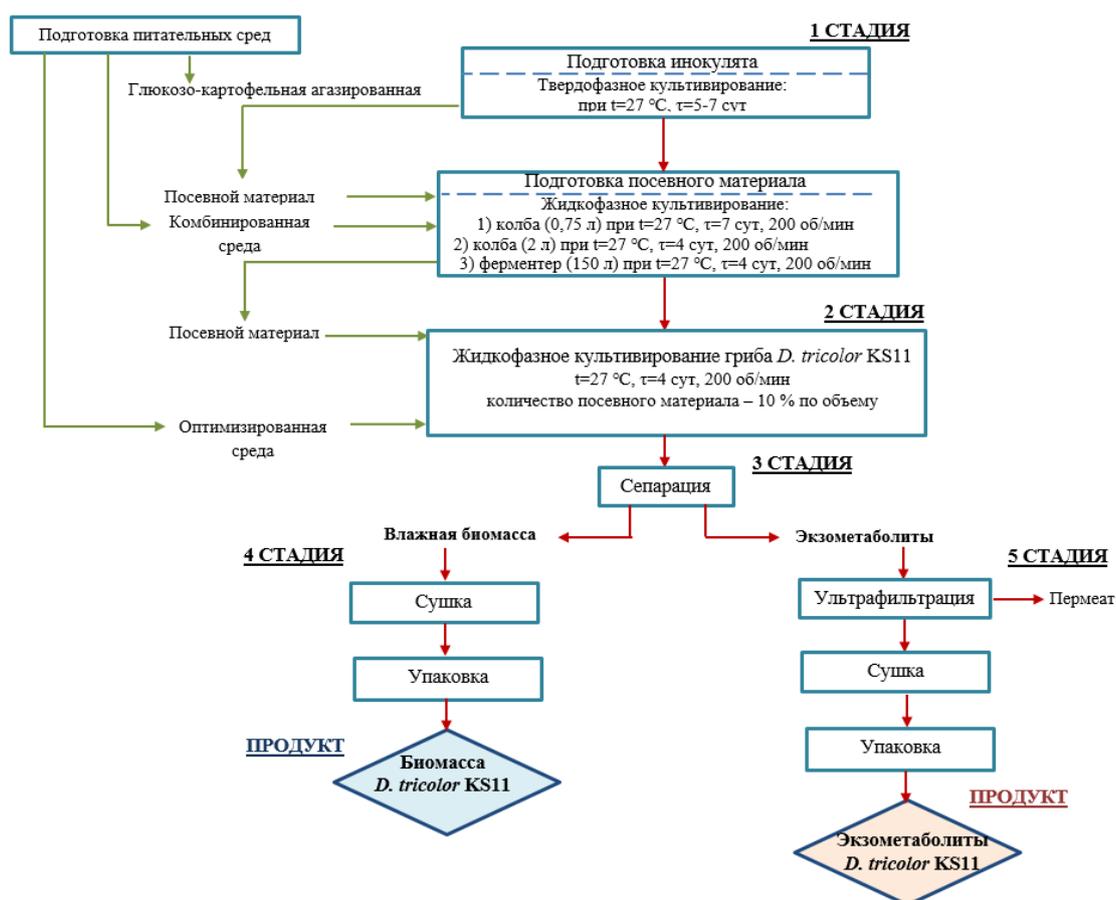


Рисунок 6.1 – Блок-схема культивирования гриба *D. tricolor* KS11

На первой стадии проводят подготовку инокулята. Для этого музейную культуру гриба выращивают в пробирке на ГКА при температуре 27 °C в тече-

ние 5-7 суток. Затем полученный инокулят переносят в качалочные колбы объемом 0,75 л, содержащие комбинированную среду, в состав которой входят глюкоза (20 г/л), дрожжевой экстракт (2,5 г/л), соевый изолят (2,5 г/л), а также минеральные компоненты, и проводят культивирование в течение 7 суток при температуре 27 °С и перемешивании 200 об/мин. После этого посевной материал последовательно выращивают 4 суток в колбах объемом 2 л и ферментере объемом 150 л на той же питательной среде при 27 °С.

На второй стадии осуществляют основной процесс культивирования в ферментере объемом 1500 л. Проводят подготовку оптимизированной среды, в состав которой входят глюкоза (10 г/л), дрожжевой экстракт (2,5 г/л), соевый изолят (3 г/л) и минеральные компоненты. Вносят выросший на первой стадии посевной материал в количестве 10 % по объему. Продолжительность ферментации составляет 4 суток, температура 27 °С и перемешивание 200 об/мин.

На третьей стадии выросший мицелий *D. tricolor* KS11 отделяют от экзометаболитов центрифугированием.

На четвертой стадии сушат влажную биомассу до содержания влаги не более 12 % и упаковывают.

На пятой стадии экзометаболиты концентрируют, сушат до содержания влаги не более 10 % и упаковывают.

Разработанная блок-схема предусматривает получение двух продуктов – биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11.

6.2 Аппаратурно-технологическая схема биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов

6.2.1 Подбор оборудования

Реализацию предлагаемой технологии можно осуществлять 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. Получение мицелия грибов погруженным способом культивирования широко применяется в промышленном масштабе для производства биологически активных веществ и ферментов. Этот метод позволяет легко автоматизировать процесс, эффективно контролировать условия роста и получать большие объемы качественной готовой продукции. Для этого в промышленности грибы культивируют в ферментерах объемом от 1500 до 3000 л. При проведении этого процесса важным параметром является подача кислорода для обеспечения культуры его достаточным количеством для хорошего роста и синтеза БАВ. Для этого предлагается использовать ферментер объемом 1500 л компании Baoxing Bio-Engineering Equipment (Шанхай), оснащенный перемешивающим устройством и барботажем, что позволит улучшить массо- и газообмен. На основании этого было подобрано остальное основное и вспомогательное технологическое оборудование, приведенное в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Основное и вспомогательное оборудование для осуществления биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11

Наименование оборудования	Марка	Характеристика	Количество, шт
1	2	3	4
Основное оборудование			
Ферментер	BLBIO-150SJA	150 л	1
Ферментер	BR200020-2	1500 л	1
Сепарационный модуль	SP250	до 10300 об/мин, 120-200 л/ч	1
Резервуар	-	1000 л	1
Резервуар	-	150 л	1
Резервуар	-	20 л	1
Ультрафильтрационная установка	BTS Engineering УФ300	300 л/ч	1
Дегидратор	Hurakan HKN-DHD80	80 поддонов размером 400×380 мм	1
Измельчитель	СП-100-БЧХ-380	до 120 кг/ч от 100 мкм до 200 мкм	1
Фасовочно-упаковочная машина	SPD-100	1-100 г, до 30 упаковок/мин	1
Вспомогательное оборудование			
Ламинарный бокс	BSC-1100ПА2-Pro	2 ULPA-фильтра	1

Продолжение таблицы 6.1

1	2	3	4
Термостат	СКТБ ТС-1/80 СПУ	80 л	1
Шейкер-инкубатор	ZWYC-290A	257 л	2
Весы	ВЛГ- 10000/1МГ4.01	до 10 кг	1
Перистальтический насос	Valisi N4 F-140	до 0,91 м ³ /ч	1

Примечание: цены указаны на 2 половину 2025 г.

6.2.2 Аппаратурно-технологическая схема

На основании блок-схемы и выбранного оборудования составлена аппаратурно-технологическая схема биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов (рис. 6.2).

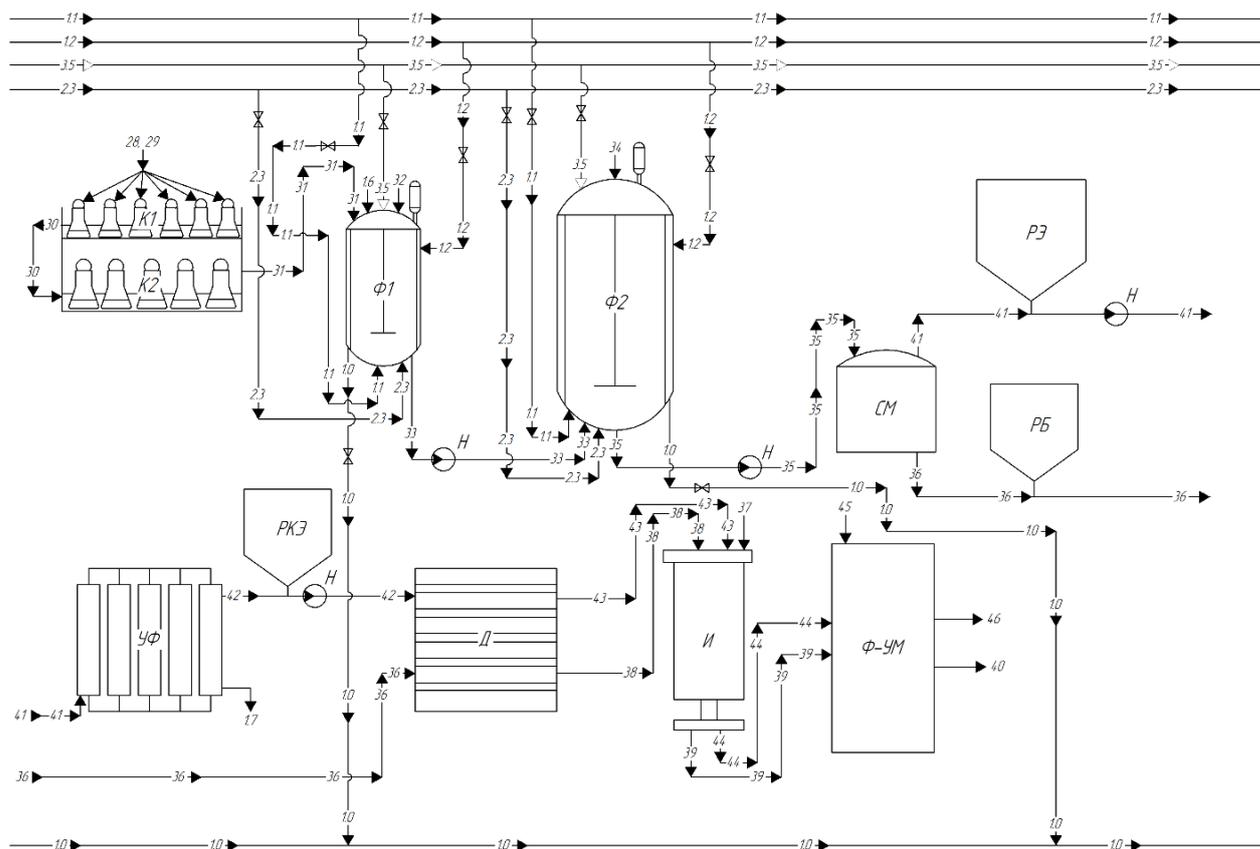


Рисунок 6.2 – Аппаратурно-технологическая схема биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов

Вначале проводят подготовку посевного материала. Музейную культуру гриба *D. tricolor* KS11 (29) вносят в качалочные колбы объемом 0,75 л (K1), содержащие 100 мл стерильной комбинированной питательной среды (28), и проводят культивирование в течение 7 суток при температуре 27 °С и перемешивании 200 об/мин. Затем 10 % посевного материал (30) вносят в колбы объемом 2 л (K2), которые содержат 400 мл стерильной комбинированной питательной среды (28), и выращивают 4 суток в аналогичных условиях. Полученный на этом этапе посевной материал *D. tricolor* KS11 (31) стерильно с помощью огненного кольца переносят в ферментер (Ф1) объемом 150 л, в котором заранее была приготовлена комбинированная питательная среда. Компоненты комбинированной среды (32) вносят в ферментер (Ф1) и перемешивают с питьевой водой (1.1). Стерилизацию среды проводят перегретым паром (2.3). Культивирование ведут в течение 4 суток при температуре 27 °С и перемешивании 200 об/мин. Процесс контролируют по таким параметрам как температура (подача холодной или горячей технической воды 1.2), рН и RH. Насыщение культуры кислородом осуществляется барботажем (3.5).

Основной процесс культивирования проводят в ферментере (Ф2) объемом 1500 л. На данном этапе для проведения выращивания гриба *D. tricolor* KS11 используют оптимизированную среду. Компоненты оптимизированной питательной среды (34) смешивают с питьевой водой (1.1) и стерилизуют с помощью перегретого пара (2.3). Затем выросший посевной материал (33) в количестве 10 % направляют перистальтическим насосом (Н) в ферментер (Ф2). Продолжительность ферментации составляет 4 суток, температура 27 °С и скорость вращения мешалки 200 об/мин. Поддержание температуры осуществляют подачей холодной или горячей технической воды 1.2. Насыщение культуры воздухом (3.5) осуществляется барботажем.

По окончании основного культивирования выросший мицелий *D. tricolor* KS11 с культуральной жидкостью (35) с помощью перистальтического насоса (Н) передают в сепарационный модуль (СМ), где с помощью центрифуги происходит их разделение на биомассу с влажностью 95 % (36) и экзометаболиты с

влажностью 99,7 % (40). Влажную биомассу (36) собирают в резервуар (РБ) и затем высушивают в дегидраторе (Д) до содержания влаги не более 12 % (38). Биомассу превращают в порошок с размером частиц 100 мкм в измельчителе (И).

Экзометаболиты (41) собирают в резервуар (РЭ) и подают с помощью насоса (Н) в ультрафильтрационную установку (УФ), где они концентрируются до содержания сухих веществ 20 %. Концентрат экзометаболитов (42) собирают в резервуар (РКЭ), далее высушивают в дегидраторе (Д) до содержания влаги не более 10 % и превращают в порошок с размером частиц 100 мкм в измельчителе (И).

Измельченную биомассу (39) и экзометаболиты (44) упаковывают с помощью фасовочно-упаковочной машины (Ф-УМ). В качестве упаковочного материала (45) используют пакеты типа doу-pack из полиэтилентерефталата и полиэтилена с многоразовым zip-lock замком. Готовые продукты – биомассу (40) и экзометаболиты (46) отправляют на склад для дальнейшего хранения и последующей реализации. Перечень оборудования и технологических потоков приведены в Приложениях Д и Е.

6.3 Расчет материального баланса получения продуктов – биомассы и экзометаболитов гриба *D. tricolor* KS11

На основании составленной аппаратурно-технологической схемы и с учетом характеристик подобранного технологического оборудования проведен расчет материального баланса биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11.

Получение посевного материала. Для получения необходимого количества посевного материала *D. tricolor* KS11 и дальнейшего его культивирования в ферментере объемом 1500 л, требуется 9 шт колб – 0,75 л, 21 шт колб – 2 л и ферментер – 150 л. Вначале инокулят музейной культуры *D. tricolor* KS11, хранящейся на скошенном ГКА, выращивают на комбинированной среде (100 мл) в колбах объемом 0,75 л (9 шт) в течение 7 суток, получают посевной материал 1. Потери при автоклавировании составляют 4 % (табл. 6.2, 6.3).

Таблица 6.2 – Приготовление комбинированной питательной среды для получения посевного материала 1

Приход			Расход		
Компонент	г	%	Компонент	г	%
Глюкоза	18,8	2,0	Комбинированная среда	900,0	96,0
Дрожжевой экстракт	2,3	0,3			
Соевый изолят	2,3	0,3			
Дигидроортофосфат калия	0,5	$5,0 \times 10^{-2}$			
Магний сернокислый	0,5	$5,0 \times 10^{-2}$			
Вода	913,1	97,4	Потери	37,5	4,0
Итого	937,5	100,0	Итого	937,5	100,0

Таблица 6.3 – Культивирование посевного материала *D. tricolor* KS11 в колбах объемом 0,75 л

Приход			Расход		
Компонент	г	%	Компонент	г	%
Комбинированная среда	900,0	100,0	Посевной материал 1:	840,0	93,3
Инокулят (музейная культура)	$5,5 \times 10^{-3}$		Культуральная среда	740,0	82,2
			Биомасса гриба	100,0	11,1
			Потери	60,0	6,7
Итого	900,0	100,0	Итого	900,0	100,0

Спустя 7 суток вырастает посевной материал 1, в достаточном количестве для дальнейшего пересева и выращивания в колбах объемом 2 л, в количестве 21 шт, содержащие 400 мл комбинированной питательной среды (табл. 6.4 и 6.5). Количество вносимого посевного материала 1 составляет 10 % от объема среды.

Таблица 6.4 – Приготовление комбинированной питательной среды для получения посевного материала 2

Приход			Расход		
Компонент	г	%	Компонент	г	%
Глюкоза	175,0	2,0	Комбинированная среда	8400,0	96,0
Дрожжевой экстракт	21,9	0,3			
Соевый изолят	21,9	0,3			
Дигидроортофосфат калия	4,4	$5,0 \times 10^{-2}$			
Магний сернокислый	4,4	$5,0 \times 10^{-2}$			
Вода	8522,4	97,4	Потери	350,0	4,0
Итого	8750,0	100,0	Итого	8750,0	100,0

Таблица 6.5 – Культивирование посевного материала *D. tricolor* KS11 в колбах объемом 2 л

Приход			Расход		
Компонент	г	%	Компонент	г	%
Посевной материал 1	8400,0	90,9	Посевной материал 2:	9000,0	97,4
Комбинированная среда	840,0	9,1	Культуральная среда	7740,0	83,8
			Биомасса гриба	1260,0	13,6
			Потери	240,0	2,6
Итого	9240,0	100,0	Итого	9240,0	100,0

По окончании культивирования (4 сутки) полученный посевной материал 2 вносят в ферментер объемом 150 л, с рабочим объемом 105 л (табл. 6.6 и 6.7). Состав питательной среды и количество инокулята аналогичны.

Таблица 6.6 – Приготовление комбинированной питательной среды для получения посевного материала 3

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Глюкоза	1,8	2,0	Комбинированная среда	90,5	96,0
Дрожжевой экстракт	0,2	0,3			
Соевый изолят	0,2	0,3			
Дигидроортофосфат калия	0,05	$5,0 \times 10^{-2}$			
Магний сернокислый	0,05	$5,0 \times 10^{-2}$			
Вода	92,0	97,4	Потери	3,8	4,0
Итого	94,3	100,0	Итого	94,3	100,0

Таблица 6.7 – Культивирование посевного материала *D. tricolor* KS11 в ферментере объемом 150 л

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Комбинированная среда	90,5	90,9	Посевной материал 3:	94,5	95,0
Посевной материал 2	9,0	9,1	Культуральная среда	5,0	5,0
			Биомасса гриба		
			Потери		
Итого	99,5	100,0	Итого	99,5	100,0

Культивирование *D. tricolor* KS11. Основной процесс культивирования осуществляется в ферментере на 1500 л с рабочим объемом 1050 л в течение 4 суток, в котором заранее стерилизуют оптимизированную питательную сре-

ду. Потери при автоклавировании составляют 4 %. В него по трубопроводу с помощью насоса поступает посевной материал 3, выросший в ферментере меньшего объема (150 л). Материальный баланс основного процесса выращивания представлены в таблицах 6.8 и 6.9.

Таблица 6.8 – Приготовление питательной среды для основного процесса культивирования

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Глюкоза	9,8	1,0	Оптимизированная среда	944,5	96,0
Дрожжевой экстракт	2,5	0,3			
Соевый изолят	3,0	0,3			
Дигидроортофосфат калия	0,5	$5,0 \times 10^{-2}$			
Магний сернокислый	0,5	$5,0 \times 10^{-2}$			
Вода	967,6	98,3	Потери	39,4	4,0
Итого	983,9	100,0	Итого	983,9	100,0

Таблица 6.9 – Культивирование гриба *D. tricolor* KS11

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Оптимизированная среда	944,5	90,9	Культуральная жидкость с биомассой	987,1	95,0
Посевной материал 3	94,5	9,1			
			Потери	51,9	5,0
Итого	1039,0	100,0	Итого	1039,0	100,0

Получение и высушивание биомассы и экзометаболитов. После завершения культивирования мицелий отделяют от экзометаболитов в сепарационном модуле (табл. 6.10).

Таблица 6.10 – Отделение биомассы от культуральной жидкости

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Культуральная жидкость с биомассой	987,1	100	Экзометаболиты	809,8	82,0
			Биомасса (влажность 95 %)	127,9	13,0
			Потери	49,4	5,0
Итого	987,1	100,0	Итого	987,1	100,0

Биомассу с влажностью 95 % высушивают до влажности не более 12 % в дегидраторе. Количество влаги, удаляемой из продукта при сушке (кг), рассчитывают по формуле:

$$W = M_B \times \left(\frac{W_1 - W_2}{100 - W_2} \right), \quad (6.1)$$

где M_B – масса влажного продукта, кг;

W_1 – начальная влажность продукта, %;

W_2 – конечная влажность продукта, %.

$$W = 127,9 \times \left(\frac{95 - 12}{100 - 12} \right) = 121,0 \text{ кг.}$$

Масса высушенной биомассы:

$$M_C = M_B - W, \quad (6.2)$$

$$M_C = 127,9 - 121,0 = 6,9 \text{ кг.}$$

Расчет данных технологических процессов показан в таблице 6.11.

Таблица 6.11 – Получение сухой биомассы *D. tricolor* KS11

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Биомасса (влажность 95 %)	127,9	100	Биомасса (влажность 12 %)	6,9	5,4
			Потери	121,0	94,6
Итого	127,9	100,0	Итого	127,9	100,0

Отделенную от биомассы культуральную жидкость подают на ультрафильтрационную установку, в которой происходит ее концентрирование до содержания сухих веществ 20 %. Количество влаги, удаляемой при концентрировании, рассчитывают по формуле 6.1:

$$W = 809,8 \times \left(\frac{99,7 - 80}{100 - 80} \right) = 797,7 \text{ кг.}$$

Количество экзометаболитов после концентрирования рассчитывают по формуле 6.2:

$$M_C = 809,8 - 797,7 = 12,1 \text{ кг.}$$

Результаты этих технологических операций приведены в таблицах 6.12, 6.13.

Таблица 6.12 – Концентрирование экзометаболитов *D. tricolor* KS11

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Экзометаболиты	809,8	100	Концентрат экзометаболитов (влажность 80 %)	12,1	1,5
			Пермеат	797,7	98,5
Итого	809,8	100,0	Итого	809,8	100,0

Концентрат экзометаболитов высушивают в дегидраторе. Количество удаленной влаги по формуле 6.1:

$$W = 12,1 \times \left(\frac{80 - 10}{100 - 10} \right) = 9,4 \text{ кг.}$$

Массу высушенных экзометаболитов рассчитывают по формуле 6.2:

$$M_c = 12,1 - 9,4 = 2,7 \text{ кг.}$$

Результаты представлены в таблице 6.13.

Таблица 6.13– Получение экзометаболитов *D. tricolor* KS11

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Концентрат экзометаболитов (влажность 80 %)	12,1	100	Экзометаболиты (влажность 10 %)	2,7	22,3
			Потери	9,4	77,7
Итого	12,1	100,0	Итого	12,1	100,0

Сводный материальный баланс биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов представлен в таблице 6.14.

Таблица 6.14– Сводный материальный баланс

Приход			Расход		
Компонент	кг	%	Компонент	кг	%
Глюкоза	11,8	1,1	Биомасса	6,9	0,6
Соевый изолят	3,2	0,3	(влажность 12 %)		
Дрожжевой экстракт	2,7	0,2	Экзометаболиты	2,7	0,2
Дигидроортофосфат калия	0,6	5×10^{-2}	(влажность 10 %)		
Магний сернокислый	0,6	5×10^{-2}	Пермеат	797,7	73,2
Посевной материал	$5,5 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-7}$			
Вода	1069,0	98,3	Потери	283,5	26,0
Итого	1087,9	100,0	Итого	1087,9	100,0

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 экзометаболических продуктов.

6.4 Разработка норм качества на продукты, получаемые при культивировании базидиомицета *D. tricolor* KS11

Существующие на рынке БАД на основе мицелия базидиомицетов, а также их метаболитов, как правило, стандартизируются по содержанию в них полисахаридов. В работе предлагается сертифицировать биомассу по такому нормируемому показателю как содержание эндопигментов, а экзометаболические продукты – по содержанию фенольных веществ и флавоноидов. Это позволит более точно рассчитать суточную дозу для каждого продукта, повысить эффективность и безопасность их применения. Разработаны требования, предъявляемые к полученным биотехнологическим продуктам на основе *D. tricolor* KS11, представленные в таблице 6.15.

Таблица 6.15 – Требования, предъявляемые к биомассе и экзометаболическим продуктам *D. tricolor* KS11

Показатели	Метод	Биомасса	Экзометаболические продукты
Внешние признаки	-	Порошок светло-коричневого цвета со специфическим запахом	Порошок светло-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 ₅₀ , 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 ⁴ ; Общее число дрожжей и плесневых грибов, КОЕ/г, не более 1×10 ² ; Отсутствие <i>E.coli</i> , в 1 г продукта	

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

Стандарты качества, разработанные для биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11 обеспечат строгий контроль и высокое качество продукции. В таблице 6.16 приведены физико-химические свойства и микробиологические показатели получаемых продуктов – биомассы и экзометаболитов.

Таблица 6.16 – Физико-химические свойства и микробиологические показатели биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11 при его погруженном культивировании на оптимизированной питательной среде (4 сутки) (n=3)

Показатели	Биомасса	Экзометаболиты
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 ₅₀ , 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 ²	1,7×10 ²
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 ди-гидрокверцетин

Проведена оценка токсикологической безопасности биомассы *D. tricolor* KS11. По результатам теста острой токсичности исследуемые образцы биомассы были отнесены к 4-му классу токсичности согласно классификации Хабриева (малотоксичные вещества, ЛД₅₀>8000 мг/кг) при проведении испытаний *in vivo* на белых самках мышей линии *ICR (CD-1)*.

Согласно полученным результатам, биомасса и экзометаболиты гриба *D. tricolor* KS11 являются безопасными, отвечают микробиологическим показателям ТР ТС 021/2011, и могут быть использованы в качестве пищевой и биологически активной добавки.

ГЛАВА 7 ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *D. TRICOLOR* KS11

7.1 График работы планируемого производства в год

Расчет производственной мощности предприятия проведен на основании режима работы ферментера объемом 1500 л, который является ведущим оборудованием.

Производство работает в круглосуточном режиме, поэтому эффективный фонд рабочего времени $T_{эф}$, дней, определяется по формуле:

$$T_{эф} = T_{ном} - T_{рем} - T_{ост}, \quad (7.1)$$

где $T_{ном}$ – номинальный фонд времени, дней;

$T_{рем}$ – простои в планово-предупредительном ремонте, дней;

$T_{ост}$ – технологические остановки, дней.

$$T_{эф} = 365 - 35 = 330 \text{ дней.}$$

Согласно разработанной биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11 за 1 цикл производства, который составляет 20 дней, можно получить 6,9 кг биомассы и 2,7 кг экзометаболитов. Продолжительность последующих циклов будет 5 дней, поскольку подготовку посевного материала начнут проводить на 6 сутки культивирования посевного материала 1 цикла (рис. 7.1). Таким образом, в год будет осуществляться 63 цикла.

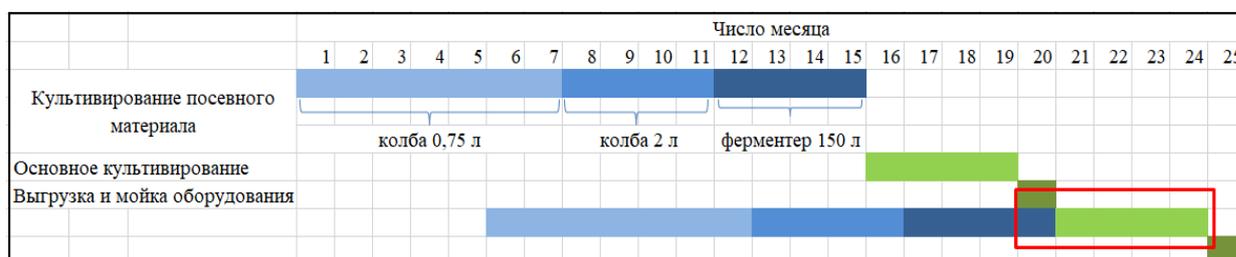


Рисунок 7.1 – График производственных циклов

Расчет годовой производительности Π_r , кг, готовых продуктов рассчитывают по формуле:

$$P_2 = a \times b, \quad (7.2)$$

где a – выход готового продукта за 1 цикл, кг;

b – количество циклов.

Биомассы:

$$P_2 = 6,9 \times 63 = 434,7 \text{ кг.}$$

Экзометаболитов:

$$P_2 = 2,7 \times 63 = 170,1 \text{ кг.}$$

Годовая производительность биомассы составит 434,7 кг и экзометаболитов 170,1 кг.

7.2 Планирование капитальных затрат

Разработанную биотехнологию погруженного культивирования гриба *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов предлагается внедрить на действующем биотехнологическом предприятии, имеющие все коммуникации. Поэтому стоимость строительства зданий и сооружений при расчете капитальных затрат не учитываются. Расчеты на покупку необходимого оборудования, затраты на его транспортировку и монтаж приведены в таблице 7.1. Транспортные расходы и расходы на монтаж оборудования приняты на основании [177].

Таблица 7.1 – Капитальные затраты и амортизационные отчисления на оборудование

Наименование оборудования	Кол-во, шт	Стоимость, тыс. руб		Амортизация	
		цена ед.	сумма	норма, %	Сумма, тыс. руб
1	2	3	4	5	6
Шейкер-инкубатор	2	1655,4	3310,9	10	331,1
Ферментер (150 л)	1	20000,0	20000,0	10	2000,0
Ферментер (1500 л)	1	80000,0	80000,0	10	8000,0
Сепарационный модуль	1	150,0	150,0	10	15,0
Резервуар (1000 л)	1	59,2	59,2	10	5,9
Резервуар (150 л)	1	26,6	26,6	10	2,7
Резервуар (20 л)	1	5,0	5,0	10	0,5
Ультрафильтрационная установка	1	111,6	111,6	10	11,2

Продолжение таблицы 7.1

1	2	3	4	5	6
Дегидратор	1	123,5	123,5	10	12,4
Измельчитель	1	45,0	45,0	10	4,5
Фасовочно-упаковочная машина	1	837,0	837,0	10	83,7
Итого:		103013,3	104668,8	10	10467,0
Прочее оборудование (10 % от общей стоимости)			10466,9	10	1046,7
Итого:			115135,7	10	11513,6
Транспортные расходы (15 % от общей стоимости)			17270,4	10	1727,0
Итого:			132406,1	10	13240,6
Монтаж оборудования (20 % от общей стоимости)			23027,1	10	2302,7
Всего			155433,2		15543,3

7.3 Расчет стоимости сырья и основных материалов

Расчет стоимости сырья и основных материалов на 1 кг продукции (биомассы и экзометаболических *D. tricolor* KS11) производится согласно материальному балансу. Транспортно-заготовительные расходы принимаются в размере 20 % от стоимости сырья. Результаты расчетов представлены в таблице 7.2.

Таблица 7.2 – Количество и стоимость сырья необходимо для получения 1 кг продукта

Наименование сырья	Цена кг, тыс. руб.	Норма расхода, кг	Стоимость тыс. руб
Глюкоза	0,8	11,8	9,4
Дрожжевой экстракт	1,7	2,7	4,6
Соевый изолят	0,8	3,2	2,5
Магний сернокислый	2,0	0,6	1,2
Дигидроортофосфат калия	5,1	0,6	3,1
Итого:			20,8
Транспортно-заготовительные расходы			4,2
Всего:			25,0

Затраты на сырье CP , тыс. руб., рассчитываются по формуле:

$$CP = (DЗ \times CC) / 100, \quad (7.3)$$

где $DЗ$ – доля от общих затрат на производство продукта, %;

CC – стоимость сырья для проектируемого производства, тыс. руб.

Доля общих затрат на производство биомассы – 76,3 %, а экзометаболитов – 23,7 %. Тогда расчет расходов на сырьё CP , тыс. руб. при производстве 1 кг продукции с учетом долевого распределения:

$$\text{Биомасса: } CP = (71,9 \times 25,0) / 100 = 18,0 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } CP = (28,1 \times 25,0) / 100 = 7,1 \text{ тыс. руб./кг.}$$

7.4 Расчет количества и стоимости энергоресурсов

Расчет количества и стоимости энергоресурсов приведен в таблице 7.3.

Таблица 7.3 – Расчет количества и стоимости воды и электроэнергии на технологические цели

Наименование затрат	Цена, тыс. руб.	Кол-во в год	Стоимость, тыс. руб. за год	Норма расхода тыс. руб. на 1 кг	
				Биомассы	Экзометаболитов
Вода, м ³	0,025	1250,0	31,3	0,05	0,04
Электроэнергия, кВт×ч	0,005	37870,0	184,8	0,31	0,31

Расчет расходов на водоснабжение K_v , тыс. руб., и электроэнергии K_e , тыс. руб., при производстве 1 кг готовых продуктов с учетом их долевого распределения составляют:

Расход на водоснабжение K_v , тыс. руб./кг:

$$\text{Биомасса: } K_v = ((71,9 \times 31,3) / 100) / 434,7 = 0,05 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } K_v = ((28,1 \times 25,0) / 100) / 170,1 = 0,04 \text{ тыс. руб./кг.}$$

Расход на электроэнергию K_e , тыс. руб./кг:

$$\text{Биомасса: } K_e = ((71,9 \times 184,8) / 100) / 434,7 = 0,31 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } K_e = ((28,1 \times 184,8) / 100) / 170,1 = 0,31 \text{ тыс. руб./кг.}$$

7.5 Расчет затрат на оплату труда персонала

Для расчета численности работников необходимо составить баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего (табл. 7.4).

Таблица 7.4 – Баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего

Показатели	Непрерывное производство
1. Календарный фонд рабочего времени	365
2. Выходные по графику смен	71
3. Номинальный фонд рабочего времени	330
4. Очередной и дополнительный отпуска	28
5. Прочие невыходы, регламентированные законом	8
6. Эффективный фонд рабочего времени в днях	294
7. Эффективный фонд рабочего времени в часах	7056

Фонд оплаты труда для персонала формируется исходя из установленных должностных окладов. Количество сотрудников и общий объем расходов на их заработную плату отображены в таблице 7.5. Величина страховых взносов составляет 30 % от общего объема годового фонда заработной платы.

Таблица 7.5 – Фонд оплаты труда персонала

Категории работающих	Численность, чел	Оклад, тыс.руб	Годовой фонд заработной платы (1 чел), тыс. руб	Годовой фонд заработной платы (общ), тыс. руб
Рабочие	4	50,0	600,0	2400,0
Руководители, специалисты	2	80,0	960,0	1920,0
Итого				4320,0
Страховые взносы				1296,0
Всего:				5616,0

7.6 Расчет сметы себестоимости готовой продукции

Смета расходов на содержание и эксплуатацию оборудования рассчитана согласно [177] и представлена в таблице 7.6.

Таблица 7.6 – Смета общепроизводственных расходов

Наименование статей затрат	Сумма, тыс руб.	Примечание
Амортизация оборудования	15543,3	Из табл. 7.1
Содержание оборудования	4320,0	Заработная плата рабочих+80 % от нее
Ремонт оборудования	7770,9	5 % от сметной стоимости оборудования
Итого:	27634,2	
Прочие производственные расходы	5526,8	20 % от итого
Всего:	33161,0	

Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования $P_{\text{общ.пр.}}$, тыс. руб., при производстве 1 кг биомасса и экзометболитов составляют:

$$\text{Биомасса: } P_{\text{общ.пр.}} = ((71,9 \times 33161,0) / 100) / 434,7 = 54,9 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } P_{\text{общ.пр.}} = ((28,1 \times 33161,0) / 100) / 170,1 = 54,8 \text{ тыс. руб./кг.}$$

Общехозяйственные расходы включают себя на текущий и капитальный ремонт зданий, их содержание и амортизацию. Поскольку было предложено внедрить разрабатываемую технологию культивирования гриба *D. tricolor* KS11 на действующем предприятии, то общехозяйственные расходы по получению готовых продуктов являются незначительными и не учитываются.

Калькуляция себестоимости 1 кг биомассы и экзометболитов приведена в таблице 7.7.

Таблица 7.7 – Калькуляция себестоимости 1 кг изделий биомассы и экзометболитов *D. tricolor* KS11

Наименование статей затрат	Сумма, тыс. руб.	
	Биомасса	Экзометаболиты
I. Материальные затраты:		
- сырье	19,10	5,90
- электроэнергия	0,31	0,31
- вода	0,05	0,04
Всего по статье I	19,5	6,3
II. Затраты на оплату труда:		
- заработная плата рабочих	9,3	9,3
III. Общепроизводственные расходы	54,9	54,8
IV Фабрично-заводская себестоимость	83,7	70,4
V. Внепроизводственные расходы (5 %)	4,2	3,5
Полная себестоимость 1 кг продукта	87,9	73,9

Формирование стоимости продукции осуществляется на основе издержек производства. Цена за 1 кг продукта OC_i , руб., рассчитывается по формуле:

$$C = (1 + P_n/100) \times C_i, \quad (7.4)$$

где P_n – планируемый размер прибыли 1 кг продукта, %;

C_i – полная себестоимость 1 кг продукта, тыс. руб.

$$\text{Биомасса: } C = (1 + 50/100) \times 87,9 = 131,9 \text{ тыс. руб.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } C = (1 + 50/100) \times 73,9 = 110,9 \text{ тыс. руб.}$$

Выручка от реализации продукции PP , тыс. руб., в год рассчитывается по формуле:

$$PP = C \times P_2, \quad (7.5)$$

где C – цена продукции, тыс. руб.;

P_2 – годовая производительность продукции, кг.

$$\text{Биомасса: } PP = 131,9 \times 434,7 = 57336,9 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } PP = 110,9 \times 170,1 = 18864,1 \text{ тыс. руб./кг.}$$

Полная себестоимость годового объема реализованной продукции C_2 , тыс. руб., рассчитывается по формуле:

$$C_2 = C_u \times P_2, \quad (7.6)$$

где C_u – полная себестоимость продукции, полученной за 1 кг, тыс. руб.;

P_2 – годовая производительность продукции, кг.

$$\text{Биомасса: } C_2 = 87,9 \times 434,7 = 38210,1 \text{ тыс. руб./г.}$$

$$\text{Экзометаболиты: } C_2 = 73,9 \times 170,1 = 12570,4 \text{ тыс. руб./г.}$$

Расчеты дохода от производства биомассы и экзометаболитов отражены в таблице 7.8.

Таблица 7.8 – Расчеты дохода от производства биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11

Показатель	Биомасса	Экзометаболиты
1	2	3
Годовая производительность, кг	434,7	170,1
Цена за 1 кг, тыс. руб.	131,9	110,9

Продолжение таблицы 7.8

1	2	3
Выручка от реализации, тыс. руб.	57336,9	18864,1
Полная себестоимость годового объема реализованной продукции, тыс. руб.	38210,1	12570,4

Использование предложенной биотехнологии выращивания гриба *D. tricolor* KS11 обеспечивает годовую производительность 434,7 кг биомассы и 170,1 кг экзометаболитов. Техничко-экономический расчёт подтверждает экономическую целесообразность получения антиоксидантов из *D. tricolor* KS11.

7.7 Расчет себестоимости единиц готовой продукции пищевых добавок и БАД на основе экзометаболитов и биомассы *D. tricolor* KS11

Полученные продукты можно использовать как в качестве индивидуальных добавок, так и в комплексе с многокомпонентными пищевыми и биологически активными добавками, а также добавлять в косметические средства. Расчитана их стоимость.

Для того, чтобы продукт на основе экзометаболитов *D. tricolor* KS11 обеспечивал антиоксидантный эффект, при приеме в сутки, необходимо чтобы он содержал 25 мг основного действующего вещества в пересчете на дигидрокверцетин. Это не превышает адекватный уровень потребления данного соединения в сутки [178]. Такое количество флавоноидов содержится в 0,93 г экзометаболитов (табл. 6.16). Стоимость упаковки с массой экзометаболитов 27,9 г на 1 месяц (из расчета 1 кг – 110,9 тыс. руб. (табл. 7.8) приема будет стоить 3094 руб.

При расчете стоимости биомассы было учтено, что БАД на основе зерномицелия грибов норма потребления, согласно инструкции, составляет 2 г в сутки. Такие БАДы кроме биомассы содержат среду выращивания, что снижает в них количество пигментов в 2 раза [48]. Поскольку биомасса, выращена на жидкой среде и не содержит сопутствующих компонентов, то ее суточная доза должна быть снижена до 1 г. Тогда стоимость курса на 1 месяц с массой био-

массы 30 г (из расчета 1 кг – 131,9 тыс. руб., табл. 7.8) будет стоить 3957 руб. Полученные данные приведены в таблице 7.9 в сравнении с существующими пищевыми добавками и БАД.

Таблица 7.9 – Стоимость курса на 1 месяц пищевых добавок и БАД, имеющихся на рынке и разработанные продукты на основе биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11

БАД	Стоимость курса на 1 месяц, руб.	Доза действующего вещества на 1 прием	
		Действующее вещество	Содержание, мг
Экзометаболиты <i>D. tricolor</i> KS11	3094	дигидрокверцетин	25
Комплекс с флавоноидами NMN («California Gold Nutrition») [179]	3914	дигидрокверцетина	25
НовОмегин («Арт Лайф») [180]	1192	дигидрокверцетин	7,5
Биомасса <i>D. tricolor</i> KS11	3957	эндопигмента	14
Зерномицелий <i>T. versicolor</i> («Om Mushrooms») [181]	4873	порошок мицелиальной биомассы	2000
Зерномицелий <i>I. obliquus</i> («Om Mushrooms») [182]	5542	порошок мицелиальной биомассы и примордий	2000
HEALTHY-One Crocetin [183]	8256	кроцетина	7,5

Осуществлено сравнение готового продукта на основе экзометаболитов *D. tricolor* KS11 с комплексной пищевой добавкой с флавоноидами («California Gold Nutrition»), а также БАД НовОмегин («Арт Лайф»). Они были выбраны, поскольку содержат в своем составе дигидрокверцетин и оказывают, в том числе антиоксидантное действие на организм. Установлено, что стоимость БАД НовОмегин наименьшая, при этом количество дигидрокверцетина в 3,3 раза ниже по сравнению с другими продуктами.

Стоимость биомассы *D. tricolor* KS11 сопоставлена с пищевыми добавками, содержащими зерномицелий *T. versicolor* и *I. obliquus*, которые являются одними из наиболее популярных и известных лекарственных базидиомицетов, а также пигментом, получаемым из плодов гардении. Показано, что БАД на ос-

нове биомассы *D. tricolor* KS11 стоит дешевле, а суточное потребление биомассы в 2 раза ниже, в связи с отсутствием остатков твердого субстрата, содержание меланина практически в 2 раза выше по сравнению с выбранными продуктами.

Проведенные расчеты, сравнения стоимости и составов показывают, что стоимость БАД, создаваемых на основе биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11 находятся на уровне с другими пищевыми добавками и БАД, аналогичного действия, это показывает перспективу их производства и применения.

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 (ДФП) IC₅₀ 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.

6) 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, β -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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lysakowska, P. Medicinal Mushrooms: Their Bioactive Components, Nutritional Value and Application in Functional Food Production – A Review / P. Lysakowska, A. Sobota, A. Wirkijowska // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – 5393 p.
2. Сакович, В.В. Базидиомицеты как источники биологически активных веществ / В.В. Сакович // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук : навуčno-практычны журнал*. - 2018. - № 1. - С. 3-13.
3. Baptista, F. Nutraceutical Potential of Lentinula edodes' Spent Mushroom Substrate: A Comprehensive Study on Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effects / F. Baptista, et al. // *Fungi*. – 2023. – Vol. 9, № 12. – 20 p.
4. Nagadesi, P.K. Mycochemicals and antidiabetic activity of lignicolous fungi – a critical review / P.K. Nagadesi, A. Stephen // *Bionature*. – 2022. – Vol. 42, № 1. – P. 13-30.
5. Cateni, F. Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: nutrition and health / F. Cateni, et al. // *Phytochem Reviews*. – 2022. – Vol. 21, № 2. – P. 339-383.
6. Flores, G.A. Fungal Biomolecules for Food and Pharmaceutical Application / G.A. Flores, et al. // *eFood*. – 2025. – Vol. 6, № 1. – 22 p.
7. Motta, F. Mushrooms and immunity / F. Motta, M.E. Gershwin, C. Selmi // *Journal of Autoimmunity*. – 2021. – Vol. 117. – 13 p.
8. Сысоева, М.А. Высокодисперсные коллоидные системы и меланины чаги: монография / М.А. Сысоева. – Казань: КНИТУ, 2013. – 228 с.
9. Сысоева, Е.В. Свойства водных извлечений меланинов чаги, полученных с применением СВЧ: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 14.04.02 / Сысоева Елена Владиславовна. – Казань, 2011. – 18 с.
10. Кулеева, И.Ш. Физико-химические и антиоксидантные свойства композитов меланина чаги с селенометионином / И.Ш. Кулеева, М.А.Сысоева, Е.В. Сысоева // *Пищевые технологии и биотехнологии. XVI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием (г. Казань, 20–23 апреля 2019 г.) : материалы конференции / под ред. А.*

С. Сироткина; Минобрнауки России, Казан. нац. исслед. технол. ун-т. – Казань : Изд-во КНИТУ, 2019. – С. 373-377.

11. Burmasova, M.A. Melanins of *Inonotus Obliquus*: Bifidogenic and Antioxidant Properties / M.A. Burmasova, A.A. Utebaeva, E.V. Sysoeva, M.A. Sysoeva // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, № 6. – 9 p.

12. Youn, M.J. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells / M.J. Youn, et al. // Journal of Ethnopharmacology. – 2009. – Vol. 121. – P. 221-228.

13. Mazurkiewicz, W. Separation of an aqueous extract *Inonotus obliquus* (Chaga). A novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells / W. Mazurkiewicz, et al. // Polish Pharmaceutical Society. – 2010. – Vol. 67, № 4. – P. 397-406.

14. Xu, H.Y. Beneficial effects of the ethanol extract from the dry matter of a culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on the antioxidant defence system and regeneration of pancreatic β -cells in experimental diabetes in mice / H.Y. Xu, et al. // Natural Product Research. – 2010. – Vol. 24, № 6. – P. 542-553.

15. Xue, J. Chemical Characterization and Hypoglycaemic Activities In Vitro of Two Polysaccharides from *Inonotus obliquus* by Submerged Culture / J. Xue, Sh. Tong, Zh. Wang, P. Liu // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – 14 p.

16. Nandi, S. A review for cancer treatment with mushroom metabolites through targeting mitochondrial signaling pathway: In vitro and in vivo evaluations, clinical studies and future prospects for mycomedicine / S. Nandi, et al. // Fitoterapia. – 2024. – Vol. 172. – 21 p.

17. Habtemariam, S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy / S. Habtemariam // Biomedicines. – 2020. – Vol. 8, № 5. – 26 p.

18. Awadasseid, A. Purification, characterization, and antitumor activity of a novel glucan from the fruiting bodies of *Coriolus versicolor* / A. Awadasseid, et al. // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 2. – 15 p.

19. Powell, M. Medicinal Mushrooms A Clinical-Guide-2nd-Edition / M. Powell. – 309 p.
20. Eliza, L.Y. Efficacy of Yun Zhi (*Coriolus versicolor*) on Survival in Cancer Patients: Systematic Review and Meta-Analysis / L.Y.W. Eliza, K.C. Fai, P.L. Chung // Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 78-87.
21. Lowenthal, R. The mycelium of the *Trametes versicolor* synn. *Coriolus versicolor* (Turkey tail mushroom) exhibit anti-melanoma activity in vitro / R. Lowenthal, et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2023. – Vol. 161. – 13 p.
22. Chen, J. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans / J. Chen, R. Seviour // Mycological Research. – 2007. – Vol. 3, № 6. – P. 635-652.
23. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // Appl Microbiol Biotechnol. – 2002. – Vol. 60, № 3. – P. 258-274.
24. Kidd, P.M. The Use of Mushroom Glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment / P.M. Kidd // Alternative Medicine Review. – 2000. – Vol. 5, № 1. – P. 4-27.
25. Zhang, Y. Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: a review of 12 years clinical studies in China / Y. Zhang, et al. // J Cancer Res Clin Oncol. – 2018. – Vol. 144, № 11. – 10 p.
26. Stilinović, N. The level of elements and antioxidant activity of commercial dietary supplement formulations based on edible mushrooms / N. Stilinović, et al. // The Royal Society of Chemistry. – 2014. - Vol. 5, № 12. – 9 p.
27. Elisashvili, V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review) / V. Elisashvili // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2012. – Vol. 14, № 3. – P. 211-239.
28. Костина, Н.Е. Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н.Е. Костина, и др // Современные проблемы науки и образования – 2013. – № 3. – 8 с.
29. Власенко, В.А. Изучение противовирусной активности лекарственных грибов рода *Phellinus S.L.* в Западной Сибири / В.А. Власенко, и др. //

Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – № 4. – С. 29-31.

30. Mohammadi, A. Schizophyllan production by newly isolated fungus *Schizophyllum commune* IBRC-M 30213: optimization of culture medium using response surface methodology / A. Mohammadi, et al. // Ann Microbiol. – 2018. – Vol. 68, № 1. – P. 47-62.

31. Bai, J. Effect of Carbon Source on Properties and Bioactivities of Exopolysaccharide Produced by *Trametes ochracea* (Agaricomycetes) / J. Bai, et al. // Int J Med Mushrooms. – 2020. – Vol. 22, № 3. – P. 289-297.

32. Colak, A. Nutritional Composition of Some Wild Edible Mushrooms / A. Colak. – 2009.

33. Cohen, N. Chemical Composition and Nutritional and Medicinal Value of Fruit Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Culinary-Medicinal Higher Basidiomycetes Mushrooms / N. Cohen, et al. // Int J Med Mushr. – 2014. – Vol. 16, № 3. – P. 273-291.

34. Shnyreva, A.V. Antiproliferative Activity and Cytotoxicity of Some Medicinal Wood-Destroying Mushrooms from Russia / A.V. Shnyreva, et al. // Int J Med Mushrooms. – 2018. – Vol. 20, № 1. – P. 1-11.

35. Клепиков, А.А. Скрининг и изучение базидиальных грибов в качестве продуцентов лакказ / А.А. Клепиков, М.М. Маркович // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2014. – № 23. – С. 39-42.

36. Park, N. Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia / N. Park, S.S. Park // International Journal of Biological Macromolecules. – 2014. – Vol. 70. – P. 583-589.

37. Okamoto, K. Characterization of two acidic β -glucosidases and ethanol fermentation in the brown rot fungus *Fomitopsis palustris* / K. Okamoto, et al. // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – Vol. 48, № 4-5. – P. 359-364.

38. Belova, N.V. Lanostane triterpenoids and steroids of higher fungi / N.V. Belova // Advances in Biology & Earth Sciences. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 107-120.

39. Bisen, P.S. Lentinus edodes: A Macrofungus with Pharmacological Activities / P.S. Bisen, et al. // CMC. – 2010. – Vol. 17, № 22. – P. 2419-2430.
40. Zhao, F. Triterpenoids from Inonotus obliquus and their antitumor activities / F. Zhao, et al. // Fitoterapia. – 2015. – Vol. 101. – P. 34-40.
41. Rösecke, J. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes / J. Rösecke, M. Pietsch, W.A. König // Phytochemistry. – 2000. – Vol. 54, № 8. – P. 747-750.
42. Qiu-Yue, Q. Produced by a Chinese Tibet Fungus Stereum hirsutum and Their Cytotoxic and Immunosuppressant Activities / Q. Qiu-Yue, et al. // Organic Letters. – 2015. – P. 3098-3101.
43. Sulkowska-Ziaja, K. Comparison of Bioactive Secondary Metabolites and Cytotoxicity of Extracts from *Inonotus obliquus* Isolates from Different Host Species / K. Sulkowska-Ziaja, et al. // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – 20 p.
44. Zhang, Y. Isolation and identification of pigments from oyster mushrooms with black, yellow and pink caps / Y. Zhang, et al. // Food chemistry. – 2022. – Vol. 372.
45. Islam, T. A systematic study on mycochemical profiles, antioxidant, and anti-inflammatory activities of 30 varieties of Jew's ear (*Auricularia auricula-judae*) / T. Islam, et al. // Food Science and Human Wellness. – 2022. – Vol. 11, № 4. – P. 781-794.
46. Arun, G. Characterization and biological activities of extracellular melanin produced by *Schizophyllum commune* (Fries) / G. Arun, M. Eyini, P. Gunasekaran // Indian Journal of Experimental Biology. – 2015. – Vol. 53. – P. 380-387.
47. Salgado-Castillo, S.N. Fungal Melanins and their Potential Applications: A Review / S.N. Salgado-Castillo, et. al. // BioResources. – 2023. – Vol. 18, № 4. – P. 8688-8706.
48. Нифантьева, Л.Н. Разработка биотехнологии культивирования гриба *Inonotus obliquus*: дис. ... канд. техн. наук: 1.5.6 / Нифантьева Ляйсян Наилевна. – Казань, 2022. – 133 с.

49. Ilyicheva, T.N. Antiviral activity of the melanin from birch fungus (*Inonotus obliquus*) obtained by cultivating f-1244 strain isolating to pure culture / T.N. Ilyicheva, et al. // Chemistry of plant raw material. – 2020. – № 2. – P. 283-289.
50. Tong, C. Characterization and Biological Activities of Melanin from the Medicinal Fungi *Ophiocordyceps sinensis* / C. Tong, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 12. – 15 p.
51. Tudor, D. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi / D. Tudor, S.C. Robinson, P.A. Cooper // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – Vol. 80. – P. 22-28.
52. Rapoport, A. Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts / A. Rapoport, et al. // Metabolites. – 2021. – Vol. 11, № 2. – 92 p.
53. Barros, L. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study / L. Barros, et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56, № 10. – P. 3856-3862.
54. Jędrejko, K.J. *Cordyceps militaris*: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity / K.J. Jędrejko, J. Lazur, B. Muszyńska // Foods. – 2021. – Vol. 10, № 11 – 25 p.
55. Коткова, В.М. Афиллофоровые грибы Псковской области / В.М. Коткова, Е.С. Попов // Новости систематики низших растений. – 2013. – Т. 47. – С. 87-121.
56. Karadžić, D. A contribution to the knowledge of fungi *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) Schröt the cause of white rot of hardwood / D. Karadžić, Z. Radulovic, D. Jovanovic, I. Milenković // Glasnik Sumarskog fakulteta. – 2023. – № 128. – P. 31-46.
57. Cho, D.H. Study of Fungal Diversity and Fungal Resources in Mt. Gwangdeok / D.H. Cho, J.Y. Chung // Korean Journal of Nature Conservation. – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 1-26.
58. Seierstad, K.S. Contrasting genetic structuring in the closely related basidiomycetes *Trichaptum abietinum* and *Trichaptum fuscoviolaceum* (*Hymenochaetales*) / K.S. Seierstad, et al. // Fungal Biology. – 2021. – Vol. 125, № 4. – P. 269-275.

59. Rösecke, J. Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor* / J. Rösecke, W.A. König // *Phytochemistry*. – 2000. – Vol. 54, № 8. – P. 757-762.
60. Na, M.W. Identification of Antibacterial Sterols from Korean Wild Mushroom *Daedaleopsis confragosa* via Bioactivity- and LC-MS/MS Profile-Guided Fractionation / M.W. Na, et al. // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 6. – 11 p.
61. Knežević, A. Antifungal, Antioxidative, and Genoprotective Properties of Extracts from the Blushing Bracket Mushroom, *Daedaleopsis confragosa* (*Agaricomycetes*) / A. Knežević, et al. // *Int J Med Mushrooms*. – 2017. – Vol. 19, № 6. – P. 509-520.
62. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* / М.А. Проценко, Г.П. Трошкова, Т.А. Косогова, Т.В. Теплякова // *Биологические науки*. – 2014. – № 14. – С. 136-140.
63. Le, T.N. Anti-ultraviolet, antibacterial, and biofilm eradication activities against *Cutibacterium acnes* of melanins and melanin derivatives from *Daedaleopsis tricolor* and *Fomes fomentarius* / T.N. Le, et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – № 14. – 11 p.
64. Moulin-Traffort, J. Effects of *Pycnoporellus fulgens* (Fr.) Donk crude extract on *Candida glabrata* ultrastructure / J. Moulin-Traffort, M.D. Steinmetz, J.P. Rascol, P. Regli // *Mycoses*. – 1999. – Vol. 42, № 4. – P. 273-279.
65. Steinmetz, M.D. In vitro antifungal activity of Polyporaceae against yeasts and dermatophytes: Antimyzetische Aktivität von Polyporaceae in vitro gegen Hefen und Dermatophyten / M.D. Steinmetz, et al. // *Mycoses*. – 1995. – Vol. 38, № 7-8. – P. 305-309.
66. Kurchenko, V.P. Biologically Active Substances in Fruit Bodies of Wood Decomposing Fungi / V.P. Kurchenko, N.V. Sushinskaya, I.S. Kiseleva, A.A. Ermoshin // *AIP Conference Proceedings*. – 2022. – № 2390 – 6 p.

67. Adhikari, M. Mycochemical and Nutritional Analysis of Selected Wild Mushrooms from Gaurishankar Conservation Area, Nepal / M. Adhikari, et al. // International Journal of Pharmacognosy & Chinese Medicine. – 2019. – Vol. 3, № 3. – 8 p.
68. Nowacka, N. Antibacterial, Antiradical Potential and Phenolic Compounds of Thirty-One Polish Mushrooms / N. Nowacka, et al. // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 10. – 13 p.
69. Smith, A. Growth-Inhibitory and Immunomodulatory Activities of Wild Mushrooms from North-Central British Columbia (Canada) / A. Smith, et al. // Int J Med Mushrooms. – 2017. – Vol. 19, № 6. – P. 485-497.
70. Zjawlony, J.K. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi / J.K. Zjawlony // Journal of Natural Products. – 2004. – Vol. 67, № 2. – P. 300-310.
71. Kuklev, D.V. Bioactive acetylenic metabolites / D.V. Kuklev, A.J. Domb, V.M. Dembitsky // Phytomedicine. – 2013. – Vol. 20., № 13. – P. 1145-1159.
72. Djamila, Y. Antibacterial activity and GC-MS analysis of *Trichaptum biforme* extract / Y. Djamila, S. Dib, Z. Fortas // Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences. – 2020. – Vol. 22, № 1. – P. 7-14.
73. Cartabia, M. Lignicolous Fungi Collected in Northern Italy: Identification and Morphological Description of Isolates / M. Cartabia, et al. // Diversity. – 2022. – Vol. 14, № 5. – 27 p.
74. Мухин, В.А. Температурная динамика роста, газообмена CO₂ и конкурентоспособности *Daedaleopsis confragosa* и *D. tricolor* / В.А. Мухин, В.Д. Владыкина, Д.К. Диярова // Микология и фитопатология. – 2023. – Т. 57, № 1. – С. 42-47.
75. Breuil, C. Decay fungi and associated rates of decay in standing trees killed by mountain pine beetle / C. Breuil // Mountain Pine Beetle Initiative working paper. – 2008. – P. 1-25.
76. Mali, T. Interactions affect hyphal growth and enzyme profiles in combinations of coniferous wood-decaying fungi of Agaricomycetes / T. Mali, J. Kuuskari, F. Shah, T.K. Lundell // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 9. – 21 p.

77. Sazanova K.V. Metabolomic Changes in Wood Inhabiting Filamentous Fungi during Ontogenesis / K.V. Sazanova, N.V. Psurtseva, A.L. Shavarda // *Metabolomics – Methodology and Applications in Medical Sciences and Life Sciences* / ed. Zhan X. IntechOpen. – 2021. – 20 p.

78. Проценко, М.А. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer / М.А. Проценко, Н.Е. Костина, Т.В. Теплякова // *Биотехнология*. – 2018. – Т. 34., № 1. – С. 45-51.

79. Красная книга Тверской области : официальный сайт. – Тверь, 2023. – URL: <https://минприроды.тверскаяобласть.рф/redbook/> (дата обращения: 18.03.2025).

80. Красная книга Амурской области : официальный сайт. – URL: <https://redbook28.ru/griby/makromicety/piknoporellus-belo-zhjoltyj/>. (дата обращения: 13.03.2025).

81. Lindner, D.L. Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America / D.L. Lindner, M.T. Banik // *Mycologia*. – 2008. – Vol. 100, № 3. – P. 417–430.

82. Lee, J. The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi / J. Lee, et al. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 2013. – Vol. 59, № 4. - P. 279-285.

83. Rollando, R. Antimicrobial, Antioxidant and T47D Cytotoxic Activities of *Trichaptum sp.*, A Fungal Endophyte from *Phyllanthus niruri* Linn.: In vitro and in silico Studies / R. Rollando, M. Hariono // *Asian Journal of Cell Biology*. – 2017. – Vol. 12, № 1 – P. 1-19.

84. Yang, X.Y. Two new drimane sesquiterpenoids from cultures of the basidiomycete *Trichaptum bifforme* / X.Y. Yang, et al. // *Natural Products and Bioprospecting*. – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 154-157.

85. Tang, B. Two new cadinane-type sesquiterpenes from cultures of the basidiomycete *Trichaptum pargamenum* / B. Tang, et al. // *Natural Product Research*. – 2017. – Vol. 31, № 20. – P. 2454-2458.

86. Zhao, J.Y. Sesquiterpenoids and an ergosterol from cultures of the fungus *Daedaleopsis tricolor* / J.Y. Zhao, et al. // Natural Products and Bioprospecting. – 2013. – Vol. 3, № 6. – P. 271-276.
87. Yaoita, Y. Terpenoids and Sterols from Some Japanese Mushrooms / Y. Yaoita, M. Kikuchi, K. Machida // Natural Product Communications. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. 419-426.
88. Kim, E.M. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. / E.M. Kim, H.R. Jung, T.J. Min // Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2001. – Vol. 22, № 1. – P. 59-62.
89. Tamrakar, S. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species / S. Tamrakar, et al. // Journal of Natural Medicines. – 2016. – Vol. 70, № 4. – P. 769-779.
90. Chikwem, J. Antimicrobial Potential of *Trichaptum Biforme* and *Bjerkandera Adusta* from Pennsylvania, USA / J. Chikwem, et al. // Journal of Natural Sciences Research. – 2020. – Vol. 11, № 16. – 8 p.
91. Проценко, М.А. Разработка технологии экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Проценко Мария Анатольевна ; науч. рук. Н.Е. Костина ; ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор". – Кольцово, 2016. – 178 с.
92. Suay, I. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities / I. Suay, et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2000. – Vol. 78, № 2. – P. 129-139.
93. Susilowati, D.N. Diversity of extracellular enzymes produced by endophytic fungus originated from *Centella asiatica* (L.) Urban / D.N. Susilowati, et al. // Jurnal Penelitian Tanaman Industri. industri. – 2020. – Vol. 26, № 2. – P. 78-91.
94. Kenkebashvili, N.V. Effect of Nutrient Medium Composition on Laccase and Manganese Peroxidase Activity in Medicinal Mushrooms / N.V. Kenkebashvili, V. Elisashvili, Y. Hadar // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 191-198.

95. Eshghi, H. Decolorization of methylene blue by new fungus: *Trichaptum biforme* and decolorization of three synthetic dyes by *Trametes hirsuta* and *Trametes gibbosa* / H. Eshghi, et al. // Eur. J. Chem. 2011. Vol. 2, № 4. P. 463-468.
96. Bhagarathi, L. A review of mushroom cultivation and production, benefits and therapeutic potentials / L. Bhagarathi, G. Subramanian, P.N.B. DaSilva // World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences. – 2023. - Vol. 15, № 1. – P. 1-56.
97. Madusanka, C. A review of recent advances in fungal mycelium based composites / C. Madusanka, et al. // Discover Materials. – 2024. – Vol. 4, № 1. – 13 p.
98. Aiduang, W. A Review Delving into the Factors Influencing Mycelium-Based Green Composites (MBCs) Production and Their Properties for Long-Term Sustainability Targets / W. Aiduang, et al. // Biomimetics. – 2024. – Vol. 9, № 6. – 337 p.
99. Yang, L. Material Function of Mycelium-Based Bio-Composite: A Review / L. Yang, D. Park, Z. Qin // Frontiers in Materials. – 2021. – Vol. 8. – 17 p.
100. Antinori, M.E. Fine-Tuning of Physicochemical Properties and Growth Dynamics of Mycelium-Based Materials / M.E. Antinori, et al. // ACS Appl. Bio Mater. – 2020. – Vol. 3, № 2. – P. 1044-1051.
101. Kim, D.S. Research Trend and Product Development Potential of Fungal Mycelium-based Composite Materials / D.S. Kim, Y.W. Kim, K.J. Kim, H.J. Shin // KSBB Journal. – 2017. – Vol. 32, № 3. – P. 174-178.
102. Holt G. Fungal Mycelium and Cotton Plant Materials in the Manufacture of Biodegradable Molded Packaging Material: Evaluation Study of Select Blends of Cotton Byproducts / G. Holt, et al. // Journal of Biobased Materials and Bioenergy – 2012. – Vol. 6, № 4. – P. 431-439.
103. Ballen, L. Current situation and future perspectives for the use of fungi in the biomaterial industry and proposal for a new classification of fungal-derived materials / L. Ballen, et al. // PeerJ Materials Science. – 2023. – Vol. 5, № 3. – 38 p.
104. Alaneme, K.K. Mycelium based composites: A review of their bio-fabrication procedures, material properties and potential for green building and con-

struction applications / K.K. Alaneme, et al. // Alexandria Engineering Journal. – 2023. – Vol. 83, № 2. – P. 234-250.

105. Danninger, D. MycelioTronics: Fungal mycelium skin for sustainable electronics / D. Danninger, et al. // Sci. Adv. – 2022. – Vol. 8, № 45. – 10 p.

106. Ferrand, H.L. Critical review of mycelium-bound product development to identify barriers to entry and paths to overcome them / H.L. Ferrand // Journal of Cleaner Production. – 2024. – Vol. 450, № 1.

107. Alemu, D. Mycelium-Based Composite: The Future Sustainable Biomaterial / D. Alemu, M. Tafesse, A.K. Mondal // International Journal of Biomaterials – 2022. – Vol. 1. – 12 p.

108. Raman, J. Mycofabrication of Mycelium-Based Leather from Brown-Rot Fungi / J. Raman, et al. // J Fungi. – 2022. – Vol. 8, № 3. – 317 p.

109. Elkhateeb, W.A. Fungi-derived leather (Mushroom leather) / W.A. Elkhateeb, et al. // MycoKing. – 2022. – Vol. 1, № 1. – 9 p.

110. Loris, G.D. Hemp Shives Mycelium Composites - An Alternative Material for Traditionally Used Plastic Packaging / G.D. Loris, et al. // Materials Science Forum. – 2022. – Vol. 1071. – P. 126-138.

111. Zhao, A. Fungal Innovation: Harnessing Mushrooms for Production of Sustainable Functional Materials / A. Zhao, et al. // Adv Funct Materials. – 2025. – Vol. 35, № 2. – 16 p.

112. Fukasawa, Y. Spatial resource arrangement influences both network structures and activity of fungal mycelia: A form of pattern recognition? / Y. Fukasawa, et al. // Fungal Ecology. – 2024.

113. Phillips, N. Electrical signal transfer characteristics of mycelium-bound composites and fungal fruiting bodies / N. Phillips, et al. // Fungal Ecology. – 2024. – Vol. 71. – 13 p.

114. Mayne, R. Propagation of electrical signals by fungi / R. Mayne, et al. // Biosystems. – 2023. – Vol. 229. – 19 p.

115. Danninger, D. MycelioTronics: Fungal mycelium skin for sustainable electronics / D. Danninger, et al. // Sci. Adv. – 2022. – Vol. 8, № 45. – 10 p.

116. Shin, H.J. Review on mushroom mycelium-based products and their production process: from upstream to downstream / H.J. Shin, et al. // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2025. – Vol. 12, № 1. – 3 p.

117. Leowattana, W. Pleuromutilin and its Derivatives: Promising Novel Anti-Infective Agents / W. Leowattana, P. Leowattana, T. Leowattana // *Anti-Infective Agents*. – 2022. – Vol. 20, № 2. – P. 28-37.

118. Bentil, J.A. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation / J.A. Bentil, et al. // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2018. – Vol. 102, № 14. – P. 5827-5839.

119. Ha, S.Y. Comparison of the metabolic profile of the mycelia and fruiting bodies of artificially cultured *Cordyceps militaris* / S.Y. Ha, et al. // *Journal of Mushroom*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 13-21.

120. Berovic, M. Cultivation of Medicinal Mushroom Biomass by Solid-State Bioprocessing in Bioreactors / M. Berovic // *Solid State Fermentation* – 2019. – Vol. 169. – P. 3-25.

121. Vunduk, J. Polysaccharides of *Pleurotus flabellatus* strain Mynuk produced by submerged fermentation as a promising novel tool against adhesion and biofilm formation of foodborne pathogens / J. Vunduk, et al. // *LWT*. – 2019. – Vol. 112. – 10 p.

122. Артлайф, грибы : официальный сайт. – URL : <https://biotech.artlife.ru/commodities/fungi> (дата обращения: 21.02.2025).

123. Билялова, А.С. Разработка технологии и товароведная оценка биологически активной добавки к пище на основе высшего базидиального гриба : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.15 / Билялова Анастасия Сергеевна ; науч. рук. Л.И. Войно ; МГУПП. – Москва, 2014. – 184 с.

124. Горшина, Е.С. Глубинное культивирование грибов рода *Trametes Fr.* с целью получения биологически активной биомассы : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23, 03.00.24 / Горшина Елена Сергеевна. – Москва, 2003. – 251 с.

125. Šťastný, J. Chemical characterization and encapsulation of *Ganoderma pfeifferi* extract with cytotoxic properties / J. Šťastný, et al. // Front Pharmacol. – 2025. – Vol. 16. – 15 p.
126. Reis, F.S. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms / F.S. Reis, et al. // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – Vol. 66. – P. 48-62.
127. Ribeiro, A. Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients / A. Ribeiro, et al. // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 188. – P. 612-618.
128. Okamura-Matsui, T. Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune* / T. Okamura-Matsui, et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2001. – Vol. 92, № 1. – P. 30-32.
129. Sysoeva M.A. Characterization and biotechnology of three new strains of basidial fungi as promising sources of biologically active substances / M.A. Sysoeva, I.Sh. Prozorova, E.V. Sysoeva, T.V. Grigoryeva, R.K. Ismagilova // Bio-Tech. – 2025. – Vol. 14, № 30. – 13 p.
130. 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 // Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии (г. Уфа, 28-29 ноября 2024 г.) : материалы XVIII Всероссийской научной интернет-конференции / редкол.: И.Г. Ибрагимов и др. – Уфа : УНПЦ «Изд-во УГНТУ», 2024. – С. 74-75.
131. Сысоева Е.В. Метаболиты, синтезируемые *Pycnoporellus 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.
132. 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 // International scientific and practical conference “Status and development prospects of fundamental and applied microbiology: the viewpoint of young scientists” 25-26 September, 2024. – С. 662-665.

133. Мудрецова-Висс, К.А. Основы микробиологии / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина, Е.В. Масленников. – М.:ИНФРА-М, 2014. – 354 с.

134. Соболева, Н.Ю. Способы культивирования, штаммовое разнообразие, антибиотическое и противоопухолевое действие базидиального гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.12 / Соболева Наталья Юрьевна. Москва, 2010. – 137 с.

135. Сысоева, М.А. Выделение штамма *Inonotus obliquus* и интенсификация роста культуры при твердофазном культивировании / М.А. Сысоева, Л.Н. Уразлина, В.Р. Хабибрахманова, Т.В. Григорьева, Е.В. Сысоева // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т.10., №1. – С. 95-106.

136. Прозорова И.Ш. Выделение эндопигментов *Daedaleopsis tricolor* KS11 и их антирадикальные свойства / И.Ш. Прозорова, Т.С. Сагдиева, М.А. Сысоева // Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг (г. Иркутск, 24-26 апреля 2025 г.) : материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием к 95-летию ИРНИТУ и кафедры химии и биотехнологии имени В.В. Тутуриной / отв. ред. Е.Г. Филатова. – Иркутск : Изд-во ИРНИТУ, 2025. – С. 89-92.

137. Хабибрахманова, В.Р. Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.) / В.Р. Хабибрахманова, А.Е. Рассабина, А.Ф. Хайруллина, Ф.В. Минибаева // Химия растительного сырья. – 2022. – №4. – С. 115-125.

138. Общая фармакопейная статья. Экстракты «ОФС.1.4.1.0021.». – 5 с.

139. Общая фармакопейная статья. Определение общей золы «ОФС.1.2.2.2.0013.15». – 2 с.

140. Полюдек-Фабини Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. – Л.: Химия. – 1981. – 624 с.

141. 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 // ВIOAsia-Altai 2024. IV Международный биотехнологический форум (г. Барна-

ул, 2024 г.) : материалы конференции / отв. за выпуск: Н.Г. Базарнова, А.Н. Иркитова, И.В. Микушина, О.Н. Мироненко, И.Н. Ротанова, С.В. Смирнов, Г.Г. Соколова, Д.Н. Щербаков. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2024. – С. 169-172.

142. Cilerdzic, J. Antioxidative potential of *Daedaleopsis tricolor* basidiocarps and mycelium / J. Cilerdzic, et al. // *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. – 2017. – № 132. – P. 19-27.

143. Saadaoui, N. Phytochemical Profiling, Antioxidant Potential and Protective Effect of Leaves Extract of Tunisian *Vitis vinifera* Autochthonous Accessions against Acute CCl₄-Injured Hepatotoxicity in Mice / N. Saadaoui, et al. // *Heliyon*. – 2023. – V.9. – 15 p.

144. Klyushova, L.S. Antioxidant Activity of New Sulphur- and Selenium-Containing Analogues of Potassium Phenosan against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in Tumour Cells / L.S. Klyushova, N.V. Kandalintseva, A.Y. Grishanova // *CIMB*. – 2022. – V.44. – P. 3131-3145.

145. Chandrawanshi, N.K. Determination of Antioxidant and Antidiabetic Activities of Polar Solvent Extracts of *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt / N.K. Chandrawanshi, D.K. Tandia, S.K. Jadhav // *Rese. Jour. of Pharm. and Technol.* – 2018. – Vol. 11, № 12. – 8 p.

146. Сысоева, М.А. Разделение водных извлечений чаги с использованием этилацетата. IV. Состав веществ фенольной и терпеновой природы, отделяемых из водного извлечения чаги этилацетатом / М.А. Сысоева, В.Р. Хабибрахманова, В.С. Гамаюрова, Г.И. Кыямова // *Химия растительного сырья*. – 2009. – №4. – С.117-122.

147. Федосеева Л.М. Идентификация фенольных соединений сухого экстракта, полученного из сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа / Л.М. Федосеева, Ю.И. Чистова // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2019. – Т.18, № 2. – С.73-77.

148. Валитова Ю.Н. Липидный профиль корней пшеницы при действии мембранотропных агентов / Ю.Н. Валитова, и др. – 2020. Т. 37, № 6. P. 466–476.

149. Общая фармакопейная статья. Определение микробиологической чистоты «ОФС.1.2.4.0002.15». – 68 с.
150. Vladykina, V.D. *Daedaleopsis* Genus in Siberia and the Far East of Russia / V.D. Vladykina, V.A. Mukhin, S.M. Badalyan // ARPHA Proceedings. – 2020. – Vol. 2. – P. 17-26.
151. Karasiński, D. An Annotated And Illustrated Catalogue Of Polypores (Agaricomycetes) Of The Białowieża Forest (NE Poland) / D. Karasiński, M. Wołkowycki // Polish Botanical Journal. – 2015. – Vol. 60, № 2. – P. 217-292.
152. Koukol, O. Taxonomic evaluation of the polypore *Daedaleopsis tricolor* based on morphology and molecular data / O. Koukol, F. Kotlaba, Z. Pouzar // Czech Mycology. – 2014. – Vol. 66, № 2. – P. 107-119.
153. Mukhin, V.A. The genus *Trichaptum* in North Asia / V.A. Mukhin, et al. // Микология и фитопатология. – 2023. – Vol. 57, № 4. – P. 255-266.
154. Buratti, S. An Example of the Conservation of Wood Decay Fungi: The New Research Culture Collection of Corticioid and Polyporoid Strains of the University of Salamanca (Spain) / S. Buratti, C. Girometta, E. Savino, S. P. Gorjón // Forests. – 2023. – Vol. 14, № 10. – 26 p.
155. Марамохин, Э.В. Культивирование мицелия и изучение фитопатогенности некоторых ксилотрофных базидиомицетов в условиях *in vitro* / Э. В. Марамохин, М. В. Сиротина, Д. Н. Зонтиков // Вестник Нижневартковского государственного университета. – 2020. – № 2. – С. 12-18.
156. Мустафин, К.Г. Подбор оптимальных условий культивирования для повышенного синтеза биомассы базидиального гриба *Trametes versicolor* / К.Г. Мустафин, и др. / Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2016. – Т. 67, № 2. – С. 151-158.
157. Широких, А.А. Влияние компонентов питательной среды и условий культивирования на рост *Trametes versicolor* в мицелиальной культуре / А.А. Широких, и др. // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. - № 3. – С. 86-93.
158. Shakhova, N.V. Revealing new active and biotechnologically perspective producers of oxidative and cellulolytic enzymes among pure cultures of ху-

lotrophic Agaricomycetes from the Southern Non-Chernozem zone of the European part of Russia / N.V. Shakhova, S.V. Volobuev // Current Research in Environmental and Applied Mycology. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 113-119.

159. González -Matute, R. Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum* / R. González -Matute, et al. // Micologia Aplicada International. – 2002. – Vol. 14, № 2. – P. 19-24.

160. 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 / M.A. Sysoeva, I.S. Prozorova, E.V. Sysoeva // JCPRM. – 2024. – № 3. – P. 313-319.

161. Ribera, J. Scalable Biosynthesis of Melanin by the Basidiomycete *Armillaria cepistipes* / J. Ribera, et al. // J. Agric. Food Chem. – 2019. – Vol. 67, № 1. – P. 132-139.

162. Mišković, J. Comparison of Two *Schizophyllum commune* Strains in Production of Acetylcholinesterase Inhibitors and Antioxidants from Submerged Cultivation / J. Mišković, et al. // JoF. – 2021. – Vol. 7, № 2. – 115 p.

163. Krupodorova, T. Enhancement of antioxidant activity and total phenolic content of *Fomitopsis pinicola* mycelium extract / T. Krupodorova, et al. // Fungal Biol Biotechnol. – 2024. – Vol. 11, № 1. – 18 p.

164. Krupodorova, T. Comparative evaluation of free radical scavenging activity and total metabolite profiles among 30 macrofungi species / T. Krupodorova, et al. // Bioresources and Bioprocessing. – 2025. – Vol. 12. – 13 p.

165. Chutimanukul, P. The Effects of Soybean Meal on Growth, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of *Hericium erinaceus* / P. Chutimanukul, et al. // Horticulturae. – 2023. – Vol. 9, № 6. – 693 p.

166. Прозорова, И.Ш. Подбор условий глубинного жидкофазного культивирования гриба *Trichaptum abietinum* KS10 / И.Ш. Прозорова, К.С. Печникова, М.А.Сысоева, Е.В. Сысоева // БиoТех-2024. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (г. Санкт-Петербург, 16-19 апреля 2024 г.) : тезисы докладов / – СПб : Изд-во ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2024. – С. 62.

167. Тюрина, Л.Е. Использование и переработка сои: учеб. пособие / Л.Е. Тюрина, Н.А. Табаков; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2008. – 90 с.
168. Ribera, J. Scalable Biosynthesis of Melanin by the Basidiomycete *Armillaria cepistipes* / J. Ribera, et al. // J. Agric. Food Chem. – 2019. – Vol. 67, № 1. – P. 132-139.
169. Gonçalves Tavares, D. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves / D. Gonçalves Tavares, et al. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2018. – Vol. 16. – P. 148-154.
170. Souilem, F. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties / F. Souilem, et al. // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 230. – P. 40-48.
171. Прозорова И.Ш. Эндопигменты грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11 и *Trichaptum abietinum* KS10 / И.Ш. Прозорова, К.С. Печникова, Е.В. Сысоева, М.А. Сысоева // Пищевые технологии и биотехнологии (г. Казань, 21-25 апреля 2025 г.) : материалы XIX Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием / под ред. А. С. Сироткина; Минобрнауки России, Казан. нац. исслед. технол. ун-т. – Казань : Изд-во КНИТУ, 2025. – С. 440-445.
172. Wang, L.F. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink / L.F. Wang, J.W. Rhim // LWT. – 2019. – Vol. 99. – P. 17-23.
173. Pralea, I.E. From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis / I.E. Pralea, et al. // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20, № 16. – 37 p.
174. Nguyen, H.A.T. Antioxidant, neuroprotective, and neuroblastoma cells (SH-SY5Y) differentiation effects of melanins and arginine-modified melanins from *Daedaleopsis tricolor* and *Fomes fomentarius* / H.A.T. Nguyen, et al. // BMC Biotechnol. – 2024. – Vol. 24, № 1. – 89 p.
175. Hou, R. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom / R. Hou, et al. // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 277. – P. 533-542.

176. Ye, M. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404 / M. Ye, et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2014. – Vol. 63. – P. 170-176.

177. Кузнецова, Г.Ф. Технико-экономические обоснование дипломных проектов (работ) Методические указания для студентов химико-технологических специальностей / Г.Ф. Кузнецова, Н.Г. Синяк. – Минск, 2012. – 64 с.

178. Решение Комиссии Таможенного Союза от 28 мая 2010 год N 299 о применении санитарных мер в Евразийском экономическом союзе (Приложение № 2 к Решению Комиссии Таможенного Союза «Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). – URL : <https://docs.cntd.ru/document/902249109?marker=64U0IK> (дата обращения 19.05.2025).

179. Iherb-russia : сайт. – URL : <https://iherbgroup.ru/product/california-gold-nutrition-nmn-nicotinamide-mononucleotide-flavonoid-complex-60-veggie-capsules/?ysclid=mfc9w10j3d103946011> (дата обращения 05.04.2025).

180. Артлайф : сайт. – URL : https://artlife-msk.ru/novomegin-60-gelej/?utm_source=yandex&utm_medium=cpc&utm_campaign=artlife_tovarnaya_rf&utm_content=15198704406&utm_term=autotargeting&ybaip=1&yclid=4114374255484600319 (дата обращения 05.04.2025).

181. Iherb-russia : сайт. – URL : <https://iherb-russia.org/product/om-mushrooms-trametes-raznotsvetnyy-667-mg-90-vegetarianskih-kapsul?ysclid=mfcdicwtq1739277306> (дата обращения 05.04.2025).

182. Iherb-russia : сайт. – URL : <https://iherbgroup.ru/product/om-mushrooms-chaga-667-mg-90-vegetable-capsules/?ysclid=mfcdk8lxbv348576354> (дата обращения 05.04.2025).

183. OknoinJapan : сайт. – URL : <https://oknoinjapan.com/krocetin-dlya-podderzaniya-zreniya-i-antioksidantnoi-zashhity-healthy-one-crocetin.html> (дата обращения 05.04.2025).

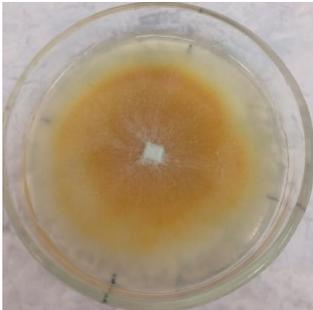
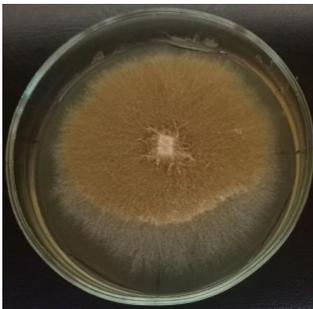
Морфология колоний *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 и на плотных питательных средах

Название гриба	Среда	Фотография роста мицелия	Описание мицелия
1	2	3	4
<i>Daedaleopsis tricolor</i> KS11	Сабуро		Бархатистый тип колонии, мицелий ровный и плотный. Окраска белая на протяжении всего времени культивирования, не пигментированная. Край колонии ровный, округлый. Выраженный грибной запах.
	Чапека		Войлочный тип колонии, мицелий неплотный, растет в виде неравномерного кольца шириной 10-15 мм. Воздушный мицелий с длинными спутанными гифами. Окраска белая на протяжении всего времени культивирования, не пигментированная. Край колонии неравномерный.
	ГКА		Войлочный тип колонии, мицелий рыхлый, вокруг инокулята наблюдается зона наименьшей плотности мицелия диаметром 5 мм. Воздушный мицелий с длинными спутанными гифами. Окраска белая на протяжении всего времени культивирования, не пигментированная. Край колонии ровный, округлый. Выраженный грибной запах.
	ГПА		Мучнистый тип колонии с очень рыхлым мицелием и зоной наименьшей плотности мицелия, практически его отсутствие диаметром 10 мм. Воздушный мицелий с длинными спутанными гифами. Окраска белая на протяжении всего времени культивирования, не пигментированная. Край колонии неравномерный. Выраженный грибной запах.

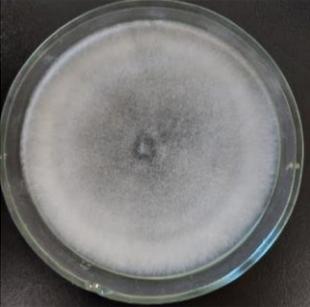
Продолжение Приложения А

1	2	3	4
<p><i>Daedaleopsis tricolor</i> KS11</p>	<p>Синтетическая с дрожжевым экстрактом</p>		<p>Бархатистый тип колонии, мицелий плотный, местами выражен буграми. Воздушный мицелий с длинными спутанными гифами. Окраска колонии белая на протяжении первых 4 суток культивирования, на 5 сутки колония приобретает коричнево-серый пигмент, причем край колонии остается белым. Край колонии неравномерный. Выраженный грибной запах.</p>
	<p>Синтетическая с дрожжевым экстрактом и энтегнином</p>		<p>Бархатистый тип колонии, мицелий плотный, местами выражен буграми. Воздушный мицелий с длинными спутанными гифами. Окраска колонии белая на протяжении первых 4 суток культивирования, на 7 сутки колония приобретает коричнево-серый пигмент, причем край колонии остается белым. Край колонии неравномерный. Выраженный грибной запах.</p>
<p><i>Pycnoporellus fulgens</i> KS12</p>	<p>Сабуро</p>		<p>Цвет колонии охристый, оранжевый, местами белый. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный мицелий в виде рыхлой паутинистой пленки на поверхности агара с длинными спутанными гифами. Край колонии неровный. Пигментация распространена неравномерно по колонии.</p>
	<p>Чапека</p>		<p>Цвет колонии белый, бледный или прозрачный. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Тип колонии шерстистый. Воздушный мицелий очень скудный, редкий, представлен длинными тонкими спутанными гифами. Наблюдается концентрическая зональность.</p>

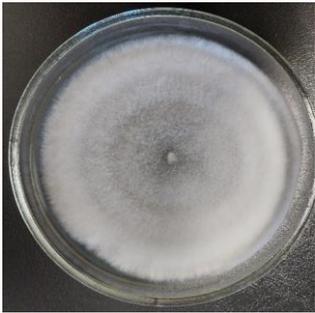
Продолжение Приложения А

1	2	3	4
<p><i>Руснопореллус fulgens</i> KS12</p>	ГКА		<p>Цвет колонии: белый, бледно-желтый. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный мицелий хлопковый, неравномерный по плотности, пушистый. Край колонии неровный, наблюдается концентрическая зональность. Пигментация распространена неравномерно по колонии, пигмент образуется в основном в центре. Выраженный грибной запах с хвойными нотами.</p>
	ГПА		<p>Цвет колонии белый, бледно-желтый. Край колонии ровный. Воздушный мицелий хлопковый, неравномерный по плотности, пушистый. (Наблюдается концентрическая зональность) Пигмент распространен по всей колонии равномерно. Выраженный грибной запах с хвойными нотами.</p>
	Синтетическая с дрожжевым экстрактом		<p>Цвет колонии желтый, оранжевый. Край колонии не ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный мицелий шерстистый, с длинными спутанными гифами. Пигмент образуется в основном в центре колонии. Наблюдается концентрическая зональность в пигментации по краям колонии. Выраженный грибной запах с хвойными нотами.</p>
	Синтетическая с дрожжевым экстрактом и энтегнином		<p>Цвет колонии желтый, охристый. Край колонии не ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный мицелий в виде рыхлой паутинистой пленки на поверхности агара. Пигментация распространяется по колонии неравномерно. Выраженный грибной запах с хвойными нотами.</p>

Продолжение Приложения А

1	2	3	4
<p><i>Trichaptum abietinum</i> KS10</p>	<p>Сабуро</p>		<p>Цвет колонии бежевый, бледно-жёлтый. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный плотный мицелий, хлопковый, гифы распространяются во всех направлениях. Наблюдается концентрическая зональность. Пигментации не наблюдается. Ярко выраженный грибной запах.</p>
	<p>Чапёка</p>		<p>Цвет колонии белый, бледный или прозрачный. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Тип колонии шерстистый. Воздушный мицелий очень скудный, редкий, представлен длинными тонкими спутанными гифами.</p>
	<p>ГКА</p>		<p>Цвет колонии белый. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Тип колонии шерстистый с войлочным воздушным мицелием. Наблюдается концентрическая зональность. Гифы короткие, стоячие. Мицелий образует компактную поверхность. Пигментации не наблюдается. Ярко выраженный грибной запах.</p>
	<p>ГПА</p>		<p>Цвет колонии белый. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Наблюдается концентрическая зональность. Мицелий воздушный войлочный, плотный. Гифы короткие, стоячие. Тип колонии шерстистый. Пигментации не наблюдается. Ярко выраженный грибной запах.</p>
	<p>Синтетическая с дрожжевым экстрактом</p>		<p>Цвет колонии белый. Край ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Воздушный войлочный мицелий с короткими стоячими гифами. Колония шерстистая. Наблюдается концентрическая зональность. Пигментации не наблюдается. Ярко выраженный грибной запах.</p>

Продолжение Приложения А

1	2	3	4
<p><i>Trichaptum abietinum</i> KS10</p>	<p>Синтетическая с дрожжевым экстрактом и энтегнином</p>		<p>Цвет колонии белый. Край колонии ровный. Цвет реверса чашки Петри не изменился. Пигментации не наблюдается. Наблюдается концентрическая зональность. Тип колонии шерстистый с войлочным воздушным мицелием. Гифы короткие, стоячие. Мицелий образует компактную поверхность. Ярко выраженный грибной запах.</p>

Сходства сиквенса *D. tricolor* KS10 со штаммами, зарегистрированными в базе данных GenBank

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT2017255 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1048	1048	100%	0.0	100.00%	803	MN836256.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT2017230 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1042	1042	99%	0.0	100.00%	809	MN836257.1
✓	Daedaleopsis tricolor strain LE-BIN 2286 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1040	1040	100%	0.0	99.65%	663	PP955083.1
✓	Daedaleopsis tricolor strain CIRM-BRFM 2542 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Unknown	1037	1037	100%	0.0	99.65%	1189	PV109037.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2000-084 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1037	1037	100%	0.0	99.65%	823	PQ516856.1
✓	Daedaleopsis tricolor strain CIRM-BRFM 2535 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Unknown	1037	1037	100%	0.0	99.65%	654	PV109031.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT2017219 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1035	1035	100%	0.0	99.65%	835	MN836255.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2004-137 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Unknown	1033	1033	99%	0.0	99.82%	850	PQ516846.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D2000089 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1033	1033	99%	0.0	100.00%	742	OK055706.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT20171951 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Unknown	1031	1031	100%	0.0	99.47%	822	MN836252.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT20172336 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Unknown	1029	1029	100%	0.0	99.47%	798	MN836259.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D2001065 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1026	1026	99%	0.0	99.82%	741	OK055703.1
✓	Daedaleopsis tricolor strain KMRB 15081217 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Unknown	1024	1024	98%	0.0	100.00%	577	MG696211.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D1999035 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1022	1022	99%	0.0	99.64%	746	OK055705.1
✓	Daedaleopsis tricolor strain KMRB 15091524 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Unknown	1018	1018	96%	0.0	99.82%	577	MG696216.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D1999075 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1016	1016	99%	0.0	99.46%	744	OK055704.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2019-330 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Unknown	1014	1014	100%	0.0	98.95%	794	PQ516849.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT2017193 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1013	1013	99%	0.0	99.11%	820	MN836251.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2002-033 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1011	1011	99%	0.0	98.94%	831	PQ516854.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2000-091 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Unknown	1011	1011	100%	0.0	98.77%	822	PQ516860.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2004-136 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Unknown	1009	1009	100%	0.0	98.77%	811	PQ516855.1
✓	Daedaleopsis tricolor voucher WU:10311 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe...	Unknown	1009	1009	98%	0.0	99.46%	577	KR108004.1
✓	Daedaleopsis tricolor voucher Dai6303 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1007	1007	97%	0.0	99.82%	557	KU892423.1
✓	Daedaleopsis tricolor voucher WU:19193 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe...	Unknown	1007	1007	98%	0.0	99.28%	578	KR108005.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D 2003-093 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Unknown	1005	1005	100%	0.0	98.43%	853	PQ516851.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate D1998109 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1005	1005	99%	0.0	99.11%	747	OK055702.1
✓	Daedaleopsis tricolor voucher Cui6018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Unknown	1003	1003	97%	0.0	99.64%	558	KU892433.1
✓	Daedaleopsis tricolor isolate DT2016047 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Unknown	1003	1003	100%	0.0	98.59%	804	MN836245.1
✓	Daedaleopsis tricolor voucher WU:28903 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe...	Unknown	1002	1002	98%	0.0	99.10%	577	KR108006.1

Сходства сиквенса *P. fulgens* KS12 со штаммами, зарегистрированными в базе данных GenBank

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Pycnoporellus fulgens strain KS12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Pycnoporellus ful...	730	730	100%	0.0	100.00%	395	OR805526.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate Ore1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Pycnoporellus ful...	723	723	100%	0.0	99.75%	611	OR365539.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher LE F-342468 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Pycnoporellus ful...	723	723	100%	0.0	99.75%	737	OP219716.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate BF1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Pycnoporellus ful...	723	723	100%	0.0	99.75%	629	ON505789.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain LE-BIN 2606 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Pycnoporellus ful...	723	723	100%	0.0	99.75%	609	OL840647.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher Cui 16463 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	612	MW377318.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate OMDL INat # 174813755 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, inte...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	621	OR882611.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher MUOB 332127 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	638	OM522307.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher CA 20(Ta) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	645	KC585385.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher UBC F32033 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	1103	KX236113.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate F 3417 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene g...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	1534	PQ652579.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher ANT003-QFB28554 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	650	MN992496.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate S.D. Russell ONT iNaturalist 137600302 small subunit ribosomal RNA gene, partial...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	626	OP749704.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain CIRM-BRFM 3593 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	636	PV109734.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate iNat59492149 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	625	OP651176.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate CA-20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	611	EU402591.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher JLF11768 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	631	PP718996.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher iNat38162173 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RN...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	590	OK346398.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate DLL2009-158 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	642	JQ673193.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher FP-133367-Sq 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	643	KC585386.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain CIRM-BRFM 797 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	603	PV108045.1
✓	Pycnoporellus fulgens isolate NAMPA2209-22 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	590	OP225581.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain CIRM-BRFM 3392 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Pycnoporellus ful...	717	717	100%	0.0	99.49%	605	PV109593.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher Dai 23001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Pycnoporellus ful...	712	712	100%	0.0	99.24%	600	OL435146.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain G033 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Pycnoporellus ful...	710	710	100%	0.0	99.24%	598	KJ195664.1
✓	Pycnoporellus fulgens voucher Cui 10033 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Pycnoporellus ful...	704	704	98%	0.0	99.48%	557	KX354458.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain Thorn-325 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gen...	Pycnoporellus ful...	699	699	100%	0.0	98.73%	602	AY218418.1
✓	Pycnoporellus fulgens strain LE-BIN 4828 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Pycnoporellus ful...	693	693	100%	0.0	98.24%	607	OQ428216.1

Сходства сиквенса *T. abietinum* KS11 со штаммами, зарегистрированными в базе данных GenBank

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum strain KS10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trichaptum abieti...	1027	1027	100%	0.0	100.00%	556	OR610
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum strain 1302BG 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal R...	Trichaptum abieti...	1016	1016	98%	0.0	100.00%	2381	FJ7686
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in...	Trichaptum abieti...	968	968	95%	0.0	99.62%	2335	U6347
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trichaptum abieti...	946	946	98%	0.0	97.46%	1762	U59097
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum strain 4-F7 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, co...	Trichaptum abieti...	638	638	63%	0.0	99.43%	354	MW081
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichaptum abietinum isolate #CA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Trichaptum abieti...	621	621	60%	8e-180	100.00%	857	KT185

	Формат	Зона	Поз.	Обозначение	Наименование	Кол.	Примечание	
Перв. примен.					Перечень технологических потоков			
				1.0	Отработанная вода			
				1.1	Питьевая вода			
				1.2	Техническая вода			
				1.6	Ледяная вода			
				1.7	Пермеат			
	Справ. №				2.3	Перегретый пар		
					3.5	Сжатый воздух		
					28	Стерильная комбинир-ная среда		
					29	Инокулят		
					30	Посевной материал		
					31	Посевной материал		
					32	Компоненты комбинир-ной среды		
					33	Посевной материал		
					34	Компоненты оптимиз-ной среды		
					35	Биомасса с культур-ной жид-стью		
	Подп. и дата				36	Биомасса (влажность 95 %)		
				37	Стерильные пакеты			
				38	Биомасса (влажность 12 %)			
				39	Измельченная биомасса			
				40	Продукт - Биомасса			
Инв. № выдл.				41	Экзамет-ты (влажность 99,7 %)			
				42	Конц-т экзамет-тов (влаж-ть 80 %)			
				43	Экзаметаболиты (влажность 10 %)			
Взам. инв. №				44	Измельченные экзаметаболиты			
				45	Упаковочный материал			
				46	Продукт - Экзаметаболиты			
Подп. и дата								
Инв. № подл.	Изм.	Лист	№ докум.	Подп.	Дата	Лит.	Лист	Листов
	Разрад.	Прозорова И. Ш						1
	Проб.							
	И.контр.							
Утв.								
Технологическая схема биотехнологии культивирования гриба <i>D. tricolor</i> KS11								

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по УР «КНИТУ», профессор, д.э.н.


Султанова Д.Ш.

«16» июня 2025 г.

Акт

О внедрении результатов кандидатской диссертационной работы
Прозоровой И.Ш.

Комиссия в составе председателя – директора института пищевых производств и биотехнологии, д.т.н., профессора Сироткина А.С. и членов: зав. каф. ПищБТ, д.х.н., профессора Сысоевой М.А.; доц. каф. ПищБТ, к.х.н. Хабибрахмановой В.Р. составили настоящий акт о том, что результаты кандидатской диссертации Прозоровой И.Ш. «Разработка биотехнологии культивирования *Daedaleopsis tricolor* для получения антиоксидантов» используются в учебном процессе, проводимом на кафедре пищевой биотехнологии.

Материалы, изложенные в диссертационной работе Прозоровой И.Ш., используются в лабораторных занятиях:

- магистрантов по дисциплине «Биологически активные добавки антиоксидантного действия», обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология»;

- магистрантов по дисциплине «Биотехнология парафармацевтиков и нутрицевтиков», обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология».

Председатель комиссии:

Директор ИПБТ, д.т.н.



А.С. Сироткин

Члены комиссии:

зав. каф. ПищБТ, д.х.н.

доц. каф. ПищБТ, к.х.н.



М.А. Сысоева

В.Р. Хабибрахманова

Заключение

по исследованию токсикологической безопасности биомассы *Daedaleopsis tricolor* KS11

Исследование острой токсичности биомассы *Daedaleopsis tricolor* KS11 было проведено на самках белых мышей линии *ICR (CD-1)* в лаборатории Химико-биологических исследований Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

В процессе исследования биомассу *Daedaleopsis tricolor* KS11 измельчали до порошкообразного состояния. Полученный порошок растворяли в ДМСО и однократно вводили животным в дозе 8000 мг/кг внутривенно, с использованием стерильных одноразовых шприцев и игл (0,45x12 мм). Масса мышей составляла 20—23 г, общее количество $n = 10$ штук. Продолжительность наблюдения за всеми экспериментальными и контрольными животными составляла 8 суток.

Через 30 минут после введения у животных наблюдалось учащенное тяжелое дыхание. Некоторые мыши замирали на 15 минут. Через 3-4 часа у всех мышей восстанавливалась активность, случаев смерти не зарегистрировано. Дыхание, состояние шерстного покрова соответствовали норме. По результатам теста острой токсичности, согласно классификации Хабриева (2005), исследуемые образцы биомассы были отнесены к 4-му классу токсичности (малотоксичные вещества, $LD_{50} > 8000$ мг/кг).

В течение эксперимента также наблюдали за изменением массы тела животных. Массу животных определяли ежедневно, перед введением исследуемого продукта, и в течение 8 дней после введения. Не наблюдалось значимых различий в показателях прироста массы тела опытных групп до и после введения.

Хабриев, Р.У. (ред.) (2005). Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. Москва: Медицина.

11.07.2025

Исследование выполнил:

Гумарова Д.Ф. лаборант-исследователь Гумарова Д.Ф.

Научный руководитель исследования:

Выштакалюк А.Б. с.н.с., д.б.н. Выштакалюк А.Б.



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института пищевых производств
и биотехнологии
Сироткин А.С.



«10» 06 2025 г.

**ДОБАВКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ
ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ГРИБА *DAEDALEOPSIS TRICOLOR* KS11**

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ (ПРОЕКТ)
ТУ 10.89.19.210-001-02069639-2025

дата введения 10.06.2025

Руководитель разработки:
д.х.н., профессор
Сысоева М.А. Сысоева

Исполнитель:
Прозорова И.Ш. Прозорова

Казань, 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института пищевых производств
и биотехнологии
Сироткин А.С.



«10» 06 2025 г.

**ДОБАВКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ
БИОМАССЫ ГРИБА *DAEDALEOPSIS TRICOLOR* KS11**

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ (ПРОЕКТ)
ТУ 10.89.19.210-002-02069639-2025

дата введения 10.06.2025

Руководитель разработки:
д.х.н., профессор
Сисоев М.А. Сысоева

Исполнитель:
Прозорова И.Ш. Прозорова

Казань, 2025 г.