

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

На правах рукописи

ПРОЦЕНКО
Мария Анатольевна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ
ПРЕПАРАТОВ ИЗ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
Костина Нина Егоровна

Кольцово – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Биологическая активность высших базидиомицетов	10
1.1.1 Вещества первичного метаболизма	10
1.1.2 Вещества вторичного метаболизма	14
1.2 Ксилотрофные базидиомицеты <i>Fomes fomentarius</i> , <i>Daedaleopsis confragosa</i> , <i>Daedaleopsis tricolor</i>	19
1.2.1 <i>Fomes fomentarius</i>	19
1.2.2 <i>Daedaleopsis confragosa</i>	20
1.2.3 <i>Daedaleopsis tricolor</i>	21
1.3 Биотехнология высших базидиомицетов	24
1.4 Характеристика методов выделения биологически активных веществ из высших базидиомицетов	27
1.4.1 Выделение комплекса биологически активных соединений	27
1.4.2 Выделение веществ первичного метаболизма	28
1.4.3 Выделение веществ вторичного метаболизма	29
1.5 Методические подходы к анализу выделенных групп биологически активных соединений	32
1.5.1 Анализ веществ первичного метаболизма	32
1.5.2 Анализ веществ вторичного метаболизма	34
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1 Материалы	41
2.2 Методы	43
2.2.1 Подготовка природного сырья для работы	45
2.2.2 Выделение комплекса БАВ из высших базидиомицетов	45
2.2.3 Введение в культуру гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i>	46
2.2.4 Пробоподготовка образцов для анализа биохимического состава и биологической активности	49
2.2.5 Методы физико-химического анализа	50
2.2.6 Методы тестирования биологической активности	54
2.2.7 Статистическая обработка полученных результатов	63

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	64
3.1 Разработка технологии выделения биологически активных веществ из высших базидиомицетов.....	64
3.1.1 Оптимизация технологии получения этанольного экстракта	68
3.1.2 Оптимизация технологии получения водного экстракта	78
3.2 Биотехнологические аспекты культивирования <i>Daedaleopsis tricolor</i> ..	82
3.2.1 Введение в культуру <i>Daedaleopsis tricolor</i>	82
3.2.2 Технология выращивания биомассы <i>Daedaleopsis tricolor</i> методами погруженного и поверхностного культивирования	91
3.3 Разработка методик анализа препаратов из высших базидиомицетов ..	99
3.3.1 Разработка методик качественного анализа на содержание тритерпенов, каротиноидов и флавоноидов	99
3.3.2 Разработка методик количественного анализа белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из высших грибов	101
3.4 Физико-химические характеристики экспериментальных образцов грибных препаратов	113
3.4.1 Физико-химические свойства экспериментальных образцов грибных препаратов <i>Daedaleopsis tricolor</i>	113
3.4.2 Физико-химические свойства экспериментальных образцов грибных препаратов <i>Fomes fomentarius</i>	124
3.5 Тестирование биологической активности экспериментальных образцов препаратов из базидиомицетов <i>in vitro</i>	127
3.5.2 Антиоксидантная активность <i>in vitro</i>	127
3.5.3 Анализ токсичности образцов <i>in vitro</i>	134
3.5.4 Противоопухолевая активность <i>in vitro</i>	136
3.5.5 Противовирусная активность <i>in vitro</i>	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
ВЫВОДЫ	149
ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ.....	150
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	171
Приложение 1 Стандартные операционные процедуры	172
Приложение 2 Справки о депонировании штаммов грибов	174

ВВЕДЕНИЕ

Изменение условий существования человечества, связанное с воздействием химических, биологических и физических факторов окружающей среды, привело и продолжает приводить к снижению адаптационных возможностей человеческого организма и его способностей к сопротивляемости. Вследствие этого во всем мире отмечается тенденция к ухудшению состояния здоровья населения и увеличению заболеваемости.

Злокачественные новообразования, будучи социально значимыми заболеваниями, являются одной из основных причин смерти населения, занимая второе место в мире после сердечнососудистых заболеваний среди причин смерти [140]. Химиотерапевтические препараты, являющиеся ведущими препаратами в терапии онкологических заболеваний, обладают токсическим действием на здоровые клетки организма, и, кроме того, их эффективность падает со временем. В связи с этим разработка и поиск новых нетоксичных лекарственных препаратов для лечения раковых заболеваний является одной из важнейших задач современной фармакологии и биотехнологии.

На сегодняшний день известно более пяти сотен видов вирусов – возбудителей заболеваний человека, и каждый год регистрируются новые штаммы и новые виды вирусов. Следует признать, что при наличии современных технологий большинство препаратов имеют узконаправленное действие при наличии побочных эффектов, токсичны и малоэффективны в острой фазе развития инфекции.

Неоднозначность проблемы проявляется в том, что фармакологи вновь и вновь возвращаются к тысячелетнему опыту древних врачей – к лекарственным средствам природного происхождения.

Перспективны в качестве природного сырья для разработки новых лекарственных препаратов грибы отдела Basidiomycota. Базидиальные грибы представляют огромный потенциал в качестве источников биологически

активных метаболитов: полисахаридов, фенольных соединений, каротиноидов, сесквитерпенов, тритерпенов, белков, меланинов, и др.

В последние годы в России наблюдается заметный всплеск внимания к созданию лекарственных препаратов на основе высших грибов и продуктов их метаболизма. Препараты природного происхождения имеют преимущества перед лекарственными средствами, получаемыми синтетическим способом, а именно: разнообразие биологически активных веществ и эффектов, низкая частота наступления побочных эффектов и возможность применения, как для профилактики, так и для лечения заболеваний. Кроме того, производство синтетических препаратов часто требует наличия дорогостоящего оборудования.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в течение нескольких лет ведутся работы по поиску и разработке новых лекарственных препаратов, как на основе плодовых тел, так и культивируемого мицелия некоторых грибов. Так, предложен ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека первого типа, содержащий водный или водно-спиртовой экстракт природных биологически активных веществ из базидиального гриба *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilat [43]. Показана высокая вируснейтрализующая активность в отношении вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) некоторых гастериоидных грибов: *Lycoperdon perlatum* Pers., *Phallus duplicatus* Bosc, *Calvatia lilacina* (Mont. & Berk.) Henn. и *Lycoperdonum brinum* Pers. [68].

Тем не менее, несмотря на возрастающее количество публикаций, описывающих наличие биологической активности грибов, лекарственные препараты на основе высших базидиомицетов практически отсутствуют на фармацевтическом рынке Российской Федерации.

Цель работы: разработка технологии получения экспериментальных образцов препаратов на основе высших базидиомицетов.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать оптимальную технологию выделения широкого спектра биологически активных веществ из высших базидиомицетов.

2. Выделить в чистую культуру новые штаммы высших базидиомицетов.
3. Получить биомассу грибов на основе выделенных штаммов.
4. Разработать методики анализа групп биологически активных веществ в объектах природного происхождения.
5. Охарактеризовать полученные экспериментальные образцы препаратов по физическим свойствам и биохимическому составу.
6. Протестировать биологическую активность экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Разработана и оптимизирована технология выделения комплекса биологически активных веществ из высших базидиомицетов. Технология апробирована на нескольких десятках видов высших грибов.

Три штамма ксилотрофного гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev & Singer переведены в чистую культуру из лесных плодовых тел гриба, очищены от микофильных организмов и депонированы в Коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» с указанием их места выделения, субстрата, систематического положения, биологической активности, культурально-морфологических особенностей.

Разработаны экспресс-методики анализа групп биологически активных соединений: белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в экспериментальных образцах препаратов природного происхождения.

Получены и охарактеризованы по физическим свойствам и биохимическому составу экспериментальные образцы препаратов из плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов Новосибирской области.

Экспериментальные образцы препаратов, на основе культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*, в большинстве случаев, показывают антиоксидантную и противоопухолевую активности выше, чем препараты из диких плодовых тел.

Положения, выносимые на защиту

Содержание анализируемых групп биологически активных соединений в мицелии гриба *Daedaleopsis tricolor* при выбранных условиях культивирования достоверно выше, чем в плодовых телах.

Биотехнологическое сырье на основе дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* обеспечивает потенциальную возможность промышленного производства грибных препаратов, обладающих широким спектром биологической активности.

Штамм *Daedaleopsis tricolor* Db-14 – перспективный биотехнологический источник для создания лекарственных препаратов широкого спектра действия.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на научных конференциях:

Четвертый Российско-Корейский симпозиум «Актуальные вопросы натуральных продуктов химии и биотехнологии» The 4th Russian-Korean Conference «Current issues of natural products chemistry and biotechnology», Новосибирск 2012.

Международная научная конференция «Фундаментальные и прикладные исследования», Италия (Рим-Флоренция) 6-13 сентября 2012.

Конференция-конкурс молодых ученых ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, 2012.

Конференция-конкурс молодых ученых ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, 2013.

IV Российская (итоговая) конкурс-конференция студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА–2013», посвященная 140-летию со дня рождения академика АМН СССР В.М. Мыша, Новосибирск, 2013.

Международная научная конференция «Рациональное использование природных биологических ресурсов» Италия (Рим-Флоренция), 10-17 апреля 2013.

Международная научная конференция «Современные проблемы клинической медицины», Ямайка, 16-26 апреля 2013.

XXI Международная конференция «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», Гурзуф, 2013.

Юбилейная конференция по медицинской микологии, Москва, 26 сентября 2013.

VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии, Москва, 2014.

Третий Международный Микологический Форум, Москва, 2015.

IX Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ», Москва, 2015.

Открытая конференция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» по вирусологии, биотехнологии и молекулярной биологии OpenBio, Кольцово, 2015.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 1 патент.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка, 35 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждения», выводов, списка литературы и приложений. Список цитированной литературы включает в себя 234 источника, из них иностранных – 117.

Личный вклад автора. Лично автором проводились работы: разработка и оптимизация технологии выделения БАВ из грибного сырья; введение гриба *Daedaleopsis tricolor* в культуру и очистка культуры гриба от микофильных грибов; выращивание биомассы мицелия гриба методами погруженного и поверхностного культивирования на основе выделенных штаммов грибов; получение экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов; разработка методик количественного анализа групп БАВ: белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов; анализ биохимического состава экспериментальных образцов препаратов базидиомицетов; пробоподготовка образцов для анализа биологической активности; тестирование антиоксидантной активности. Тестирование цитотоксической активности экспериментальных образцов препаратов на опухолевых клетках проводилось на базе лаборатории питательных сред при участии автора. Противовирусную активность экспериментальных образцов препаратов базидиомицетов в отношении вирусов гриппа, вируса

простого герпеса 2-го типа и вируса осповакцины тестировали сотрудники лаборатории препаратов природного происхождения. Микрофотографии получены сотрудником лаборатории микологии.

Благодарности. Автор благодарен коллегам, принимавшим участие в проведении исследований и обсуждении результатов, а именно: д.б.н Тепляковой Т.В., к.б.н Косоговой Т.А., Бардашевой А.В., к.б.н Ананько Г.Г., д.б.н Мазурковой Н.А., д.б.н Шишкиной Л.Н., Макаревич Е.В., Ибрагимовой Ж.Б., Сумкиной Т.П., к.м.н Нечаевой Е.А., д.б.н Трошковой Г.П., Скарнович М.А. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю к.б.н. Костиной Нине Егоровне.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологическая активность высших базидиомицетов

В настоящее время грибы базидиомицеты активно изучаются с точки зрения их применения в медицине и фармации, т.к. они имеют в своем составе широкий спектр различных БАВ, таких как полисахариды, сесквитерпены, тритерпены, белки, меланины, каротиноиды, фенольные соединения, в том числе флавоноиды и др. [195]. Сложность и многообразие химического состава базидиомицетов обуславливает широкий спектр механизмов их действия на организм.

1.1.1 Вещества первичного метаболизма

1.1.1.1 Полисахариды

Биологически активные полисахариды широко представлены в составе высших базидиомицетов, большинство из них имеет уникальное строение у разных видов.

Полисахариды базидиальных грибов способны стимулировать врожденную иммунную систему и оказывать противоопухолевую активность через стимуляцию иммунитета организма хозяина. Например, β -D-глюканы могут индуцировать биологический ответ путем соединения с мембраной комплементарных рецепторов третьего типа (CD11b/CD18, CR3, α M β 2 интегрин) на иммунокомпетентных клетках. Происходит активация таких эффекторных клеток как макрофаги, Т-лимфоциты и NK-клетки, способных секретировать цитокины, к примеру фактор некроза опухоли, интерферон- γ , интерлейкин-1 β и т. д., которые оказывают антипролиферативный эффект и способствуют индукции апоптоза и дифференциации в клетках опухолей [168; 217].

Установлено, что β -глюканы лентинан из *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, шизофиллан из *Schizophyllum commune* Fries, грифолан и SSG из *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray проявляют противоопухолевую активность [137]. Полисахариды грибов *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr., *Inonotus obliquus* и

Wolfiporia cocos (F.A. Wolf) Ryvarden & Gilb оказывают противоопухолевое и иммуномодулирующее действие [233].

Противоопухолевую активность проявляют полисахариды из дереворазрушающего гриба *Piptoporus betulinus*, ингибируя рост саркомы S-180 и карциномы Эрлиха на 90 % [182].

Полисахарид (LA) из плодового тела гриба *Pleurotus abalonus* Y.H. Nan, K.M. Chen & S. Cheng, полисахаридно-белковый комплекс из *Trametes versicolor*, убиквитинподобный гликопротеин из *Pleurotus ostreatus*, а также полисахариды гриба *Grifola frondosa* обладают активностью в отношении вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) [129; 176; 210; 213]. D-фракция гриба *Grifola frondosa*, содержащая полисахарид β -глюкан, способна ингибировать вирус гепатита В и стимулировать естественный иммунитет посредством активации НК-клеток [142; 154].

Показано, что полисахариды *Lentinula edodes* проявляют активность, в отношении вируса иммунодефицита человека, аденовируса 12 типа, вируса гриппа А, энцефалита [206], полиовируса типа 1 и бычьего вируса герпеса типа 1 [188], вируса лихорадки Западного Нила [215] и вируса гриппа [189].

Полисахариды, содержащиеся в экстрактах *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., проявляют активность против вируса лихорадки Западного Нила [187]. Полисахариды *Ganoderma lucidum* также проявляют активность в отношении вируса гепатита В [138], вирусов простого герпеса 1 и 2 типов [186]. Полисахаридная фракция *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quel., показала активность против вируса болезни Ньюкасла [178]. Суммарные полисахариды, выделенные из культивируемого мицелия *Phellinus conchatus* (Pers.) Quel., проявляют противовирусный эффект в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) [17].

1.1.1.1 Хитин и хитозан

Хитин и является основным компонентом клеточной стенки грибов. В клеточных стенках грибов содержится и хитозан, образующийся под воздействием ферментов – хитиназ.

На сегодняшний день известно более 70 направлений применения хитина и хитозана: пищевые добавки, многокомпонентные пищевые продукты; лекарственные препараты, в том числе противоопухолевые средства; косметические препараты; средства для очистки и стабилизации воды в естественных и искусственных водоемах; сельскохозяйственные препараты для борьбы с болезнями растений [5].

В последние годы возрастает интерес исследователей к применению хитиновых сорбентов. Хитины обладают хорошими сорбционными свойствами и имеют возможности химической модификации. Основным механизмом сорбции у хитина является образование хелатов, поэтому он связывает практически все тяжелые металлы [87].

Установлена противовирусная активность в отношении вируса табачной мозаики и высокая антибактериальная активность в отношении *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis* и *Bifidobacterium bifidum* низкомолекулярных хитозанов, которая существенно возрастает с уменьшением степени их полимеризации [20; 30].

1.1.1.2 Белки

Белки — высокомолекулярные органические вещества, состоящие из α -аминокислот, соединенных в цепочку пептидной связью.

Из-за низкого содержания жира и отсутствия холестерина, многие грибы являются отличными источниками белка. Известны различные типы белков, содержащихся в грибах, такие как лектины, иммуномодулирующие белки, рибосом-инактивирующие белки, рибонуклеазы, ферменты лигнинолитического комплекса и другие белки. Практически все грибные белки являются перспективными источниками для создания препаратов, оказывающих

противоопухолевое, противовирусное, антимикробное, антиоксидантное и иммуномодулирующее действие [223].

Лектины *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer показали противоопухолевую активность на линии клеток карциномы S-180A [167]. Лектины из *Grifola frondosa*, проявляли цитотоксичность на клетках Hela [151]. Лектины *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach обладают антипролиферативной активностью в отношении клеток человеческой опухоли кишечника HT29 и клеток рака молочной железы MCF-7 [227]. Показано, что лектины *Tricholoma mongolicum* S. Imai подавляли рост клеток мастоцитомы P815 *in vitro* и карциномы S-180 *in vivo* [214].

Белок, выделенный из водного экстракта *Cortinarius caperatus* (Pers.) Fr., ингибировал репликацию вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, вируса гриппа типа А и цитомегаловирусов. Полученный белок осаждался ацетоном и далее подвергался гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Белок RC28 подавлял репликацию вируса простого герпеса 1 типа [185]. Белок, полученный из экстракта *Grifola frondosa*, состоящий из 11 аминокислот, обладает противогерпетической активностью [141].

Показано, что лектины, выделенные из плодовых тел *Pleurotus citrinopileatus* Singer и *Lactarius flavidulus* S. Imai, маннозо-специфический лектин (HRL) из *Hygrophorus russula* (Schaeff.) Kauffman, низкомолекулярный белковый комплекс (содержащий велютин) гриба *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, марморин из гриба *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow, металлопротеаза из плодовых тел *Lepista nuda* (Bull.) Cooke и рибонуклеазы из свежих культивируемых плодовых тел *Schizophyllum commune* Fr. способны ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 [165; 203; 212; 221; 222; 229].

Гемолитический протеин (небродеолизин) *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga) Quel. показал активность в отношении ВИЧ-1 в культуре клеток СЕМ [174].

Внеклеточные лигнолитические ферменты, а именно лигнин-пероксидаза, Mn-пероксидаза и лакказы, катализируют окисление широкого круга соединений, включая полифенолы и лигниноподобные соединения.

Лакказы, выделенные из *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr., *Ganoderma lucidum*, *Agaricus placomyces* Peck, *Lentinula edodes*, *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland, *Tricholoma mongolicum* и очищенные с помощью аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, способны ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 [164; 201; 211; 220; 234].

1.1.2 Вещества вторичного метаболизма

1.1.2.1 Сесквитерпены

Сесквитерпены – класс терпенов, в который входят углеводороды от $C_{15}H_{24}$ до $C_{15}H_{32}$, а также их кислородсодержащие производные (спирты, альдегиды, кетоны). Они распространены в растениях, найдены в базидиальных грибах. Эти соединения играют роль в формировании запахов [103].

Сесквитерпены, выделенные из гриба *Lactarius ividus* (Fr.) Fr., показали активность по отношению к вирусу простого герпеса 1 типа на клеточных культурах Vero (перевиваемая клеточная линия почки африканской зеленой марышки) [156]. Экстракты из плодового тела гриба *Omphalotus illudens*, содержащие сесквитерпен иллудин S, проявляли активность против вируса простого герпеса 1 типа [161].

1.1.2.2 Тритерпены

Тритерпеновые сапонины делятся на две группы: тетрациклические (содержат в структуре агликона четырех-, пяти- или шестичленные углеродные кольца) пентациклические (содержат в структуре агликон, состоящий из пяти- или шестичленных углеродных колец). Тетрациклические тритерпеновые сапонины относятся к группам даммарана, циклоартана, ланостана, кукурбитана. В базидиомицетах содержатся преимущественно ланостановые тритерпены [150;180;191].

Известно, что тритерпены, выделенные из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*, могут воздействовать непосредственно на опухолевые клетки с помощью следующих механизмов: ингибирование активности фарнезил-протеин-трансферазы [160]; проявление антиоксидантной активности [232];

ингибирование активности 5 α -редуктазы [169]; подавление активности HMG-CoA редуктазы и ацил-CoA ацилтрансферазы в стадии синтеза мевалоновой кислоты [162].

В основе молекулярного механизма антипролиферативного действия тритерпенов из *Ganoderma lucidum* лежит индукция апоптоза за счет подавления p38 митоз-активирующей киназы [205].

Инотодиол, выделенный из *Inonotus obliquus*, является одним из ланостановых тритерпеноидов, который обладает противоопухолевой активностью. Механизм антипролиферативного действия обусловлен индукцией ДНК фрагментации и активации каспазы-3/7, которая является биохимическим маркером апоптоза [180].

Ланостановые тритерпены, в частности полипоровая кислота, гриба *Piptoporus betulinus*, показывали противовоспалительную активность [148].

Установлено, что выделенные экстракцией метанолом из *Ganoderma lucidum* тритерпены, в частности, ганодермадиол, ганодерманонтриол, люцидадиол, аппланоксидея кислота G и ганодериол F ингибировали *in vitro* вирус гриппа A, и проявляли выраженную активность в отношении ВИЧ-1 на клеточной линии MT-4 (перевиваемые Т-лимфоциты человека) [135]. Ганодеровые кислоты из *Ganoderma lucidum* ингибируют репликацию вируса гепатита B [166].

Ганодермадиол, люцидадиол, аппланоксидея кислота G из *Ganoderma pfeifferi* Bres. показывают *in vitro* противовирусный эффект в отношении вируса гриппа типа A. Кроме того, ганодермадиол активен в отношении вируса простого герпеса типа 1 [177]. Ланостановые терпены (ганодеровые кислоты, 20(21)-дегидролюциденовая кислота N и 20-гидроксилюциденовая кислота A) из гриба *Ganoderma sinense* J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang ингибировали протеазу ВИЧ-1 [191]. Тритерпены (колосолактоны), выделенные из плодовых тел гриба *Ganoderma colossum* (FR.) C. F. Baker., показывали ингибирование протеазы ВИЧ-1 [134], а ланостановые тритерпеновые кислоты, выделенные из эпидермиса склероции *Poria cocos*, показали активность против вируса Эпштейн–Барр [119].

Ланостановый тритерпен (20 S,22 S,23 E)-22-О-ацетин-25-гидроксиланоста-8,23(E)-диен-3-он, выделенный из *Scleroderma citrinum* Pers., показал значительную активность в отношении вируса простого герпеса типа 1 [150].

1.1.2.3 Фенольные соединения

Фенольные соединения представляют собой группу разнообразных химических соединений, обеспечивающих широкий спектр фармакологического действия. Антиоксидантные и антирадикальные свойства фенолов играют большую роль в стабилизации продуктов питания, проявляя механизмы антиоксидантной защиты биосистем. Антиоксидантный эффект фенольных соединений и флавоноидов проявляется за счет их способности связывать свободные радикалы и хелатировать прооксидантные ионы металлов. Следует отметить что, фенольные соединения, в том числе флавоноиды, содержащиеся в высших грибах, обладают иммуномодулирующей и противовирусной активностью [120; 158; 230].

Экстракты *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* и *Volvariella volvacea*, содержащие фенольные соединения демонстрируют антиоксидантную и антирадикальную активности [127; 171; 225]. Фарнезилфенол, производное грифолина, выделенный из *Albatrellus* Sp., обладает антиоксидантной активностью выше, чем общеизвестные антиоксиданты: α -токоферол или трет-бутилгидроксианизол [181].

Фенольные соединения грибов *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. и *Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen) P. Karst., представленные в основном протокатеховой, пара-гидроксibenзойной и ванилиновой кислотами, проявляли сильную антиоксидантную активность, которая оценивалась методом восстановления трехвалентного железа [200].

Стирилпироновые полифенолы грибов *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng, *Phellinus igniarius* (L.) Quel., *Phellinus ribis* (Schumach.) Ryvardeen, *Inonotus obliquus* и *Hymenochaete xerantica* (Berk.) S.H. He & Y.C. Dai оказывали антиоксидантное и противовирусное действие [158].

Противовирусную активность проявляют этанольные экстракты *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst., содержащие хиспидин и хисполон, против вируса гриппа типа А и типа В [120]. Эти вещества, содержащиеся также в *I. obliquus*, проявляют иммуномодулирующий эффект [230].

Водорастворимые высокомолекулярные лигнины из гриба *Inonotus obliquus*, ингибировали протеазу ВИЧ-1. При этом низкомолекулярные лигнины из *I. obliquus*, протеазу не ингибировали [146].

Антиретровирусным эффектом обладает фракция водорастворимых лигнинов, выделенная и очищенная из культуральной среды мицелия *Lentinula edodes*. Очищенная фракция способствует активации макрофагов и пролиферации клеток костного мозга [202].

1.1.2.4 Меланины

Меланины представляют собой высокомолекулярные полимеры нерегулярной структуры фенольной и (или) индольной природы. По химическому строению они подразделяются на три класса: эу-, фео- и алломеланины. При этом грибы содержат преимущественно эумеланины и алломеланины. Для меланиновых пигментов характерно наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных реакционноспособных функциональных групп, а также системы сопряженных двойных связей в молекулах меланинов. Меланины проявляют иммуномодулирующее, противовоспалительное, сильное антиоксидантное, фотопротекторное и антимуtagenное действие [62].

Меланины способны снижать мутагенное действие хронического облучения. При этом радиозащитная эффективность меланинов в случае терапии после хронического облучения выше, чем после острого облучения. Меланины являются очень сильными акцепторами и донорами электронов и обладают высокой антирадикальной активностью [72].

Доказано, что экстракты мицелия грибов *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum*, содержащие меланиновые пигменты, *in vitro* стимулируют фагоцитарную активность нейтрофилов, обладают высокой антиоксидантной активностью (до

95% по отношению к ионолу), в условиях *in vivo* обладают высоким иммуностропным действием [84].

Меланины, выделенные из плодовых тел и культивируемого мицелия *Inonotus obliquus*, проявляли ингибирующий эффект в отношении ВИЧ-1. Следует отметить, что активность меланинов из природного сырья превышала в 14 раз активность меланинов, полученных из культивируемого мицелия гриба [18].

1.1.2.5 Каротиноиды

Каротиноиды по химической природе являются тетратерпенами. К каротиноидам относят каротины, ксантофиллы и некоторые продукты циклизации и потери части углеродного скелета ликопина.

В составе каротиноидных пигментов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* выявлено 3 фракции, которые являются ксантофиллами, а точнее, кетокаротиноидными кислотами. Спиртовые экстракты мицелия гриба, содержащие ксантофиллы, проявляют высокую антиоксидантную и радиопротекторную активность (70-90% по отношению к ионолу) [19]. Также известно, что ксантофилльный каротиноид из *L. sulphureus* лаеипораксантин обладает и противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса первого типа, а спиртовые экстракты мицелия, содержащие каротиноиды, обладают иммуномодулирующим действием [44; 45].

Анализ литературных данных о биологической активности высших базидиомицетов показал, что различные группы БАВ грибов, такие как полисахариды, белки, фенольные соединения, тритерпены, сесквитерпены, меланины, каротиноиды, показывают противоопухолевую, антиоксидантную, иммуномодулирующую и противовирусную активности. Отмечено, что полисахариды из высших грибов являются наиболее изученными в отношении биологической активности.

1.2 Ксилотрофные базидиомицеты *Fomes fomentarius*, *Daedaleopsis confragosa*, *Daedaleopsis tricolor*

Базидиальные макромицеты-ксилотрофы – одна из важнейших трофических групп грибов, играющих в лесных экосистемах огромную роль. Грибы-ксилотрофы осуществляют поэтапное разложение лигниноцеллюлозных комплексов древесины, способствуют образованию гумуса, а также трансформируют в цепи питания через плодовые тела и насекомых-мицетофагов различные микроэлементы. Помимо этого, они представляют собой ценный биологический ресурс. В последние годы особенно привлекают внимание фармакологов дереворазрушающие базидиомицеты как продуценты БАВ, обладающих антиоксидантными, противоопухолевыми, противовирусными свойствами. К таким грибам относятся *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt. и *Daedaleopsis tricolor* [147; 184; 204].

1.2.1 *Fomes fomentarius*

Одним из наиболее распространенных дереворазрушающих грибов среди лесных базидиомицетов (от 50 до 76%) является Трутовик настоящий *Fomes fomentarius*, относящийся к семейству Fomitaceae [3]. Мультирегиональный вид. Развивается на древесине березы, осины и других лиственных породах. Наиболее характерным субстратом является береза [2].

В глубинной культуре базидиомицет *F. fomentarius* выращивают, как правило, на глюкозопептонной среде различного состава [51; 111; 125]. Гриб *F. fomentarius* обладает широким спектром биологических активностей: противоопухолевой, иммуномодулирующей, антиоксидантной [184]. Полисахариды, выделенные из культивируемого мицелия *F. fomentarius*, оказывают антипролиферативное воздействие *in vitro* на клетки SGC-7901 (рак желудка) [126], водный экстракт гриба нормализует уровень глюкозы в крови и липидный обмен, а также снижает активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, стимулирует тканевое дыхание [159], а этанольный экстракт гриба проявляет железо-восстанавливающую способность [48]. В Японии и Корее экстракт *F. fomentarius* в сочетании с лекарственными растениями применяют в

составе функциональных напитков для профилактики раковых заболеваний и диабета, для лечения нервных заболеваний и нормализации состава крови [159].

Выявлена также и противовирусная активность данного гриба. Мицелий *F. fomentarius* активен в отношении вируса гриппа H1N1 [60]. Установлено, что выделенные из мицелия гриба *F. fomentarius* водорастворимая и водонерастворимая полисахаридные фракции оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, оказывая, таким образом, иммуномодулирующий эффект. Более выраженный стимулирующий эффект на макрофаги оказывала водорастворимая углеводная фракция [51]. Показано, что водорастворимый меланин-глюкановый комплекс гриба, состоящий из меланина (80%) и β -глюканов (20%), обладал слабой токсичностью и высокой противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 активностью по сравнению с препаратом нуклеозидной природы – зидовудином [193]. Биологически активная добавка микотон «Микотон-Агликон», (состав: хитин 70%, бета-глюканы – 20%, меланины – 10%), получаемая из *F. fomentarius*, обладает высокой активностью против вируса простого герпеса *in vitro* и *in vivo*, превосходя по действию такие противовирусные препараты, как зовиракс, герпевир, медовир, вальтрекс, ганцикловир, изопринозин, гропринозин, амиксин, альпизарин [7; 25]. Механизм противовирусного действия, предположительно, связан с сорбирующей способностью БАВ микотона, преимущественно хитина.

1.2.2 *Daedaleopsis confragosa*

Высший базидиомицет Дедалеопсис бугристый *Daedaleopsis confragosa* относится к семейству Coriolaceae. Гриб распространен практически по всей территории России. Циркумбореальный вид. Субстратом являются лиственные деревья, преимущественно ивы. Гриб растет на пнях, валежнике и сухостое деревьев [2].

Для культивирования гриба *D. confragosa* глубинным способом используют жидкие питательные среды, такие как меласса-кукурузный экстракт (меласса – 40 г/л; кукурузный экстракт – 15 г/л; калия дигидрофосфат – 3 г/л; магния сульфат

– 0,2 г/л) [22]. Для жидкофазного культивирования поверхностным способом используют модифицированную среду Чапека [33].

Водорастворимые полисахариды, выделенные из биомассы мицелия гриба *D. confragosa*, проявляют противоопухолевый эффект, ингибируя рост саркомы S-180 и карциномы Эрлиха на 90 % при введении внутрибрюшинно белым мышам в дозе 300 мкг/мл [182]. Метанольный экстракт из гриба, содержащий тритерпены, цитотоксически активен в отношении лимфолейкоза мышей (линия клеток L1210), при этом концентрация, ингибирующая рост клеток на 50 %, составила 74,5 мкг/мл [207].

Водные экстракты плодового тела и культивируемого мицелия гриба *D. confragosa* проявляют противовирусную активность в отношении вирусов гриппа H5N1 (A/chicken/Kurgan/05/2005) и H3N2 (A/Aichi/2/68) [39; 204]. А этанольный экстракт плодового тела показывает антиоксидантную и антирадикальную активность [209].

Установлено, что белковые фракции, выделенные из выращенной биомассы гриба *D. confragosa*, обладают противовирусной активностью в отношении вируса иммунодефицита человека и вируса простого герпеса 2-го типа [22].

1.2.3 Daedaleopsis tricolor

Ксилотрофный гриб Дедалеопсис трехцветный *Daedaleopsis tricolor* из семейства Coriolaceae является евроазиатским южно-бореальным видом. Данный вид распространен на территории России от западных рубежей до Дальнего Востока. Гриб развивается на валежных стволах и ветвях, иногда на пнях лиственных пород [2].

Согласно литературным данным метаболиты, выделенные из плодовых тел гриба, проявляют антиоксидантную, антирадикальную, противоопухолевую и слабую антибактериальную активность.

Известно, что соединение тритерпенового ряда 20(29)-люпен-3-он, выделенное из плодовых тел *D. tricolor*, обладает антибактериальной и антиоксидантной активностью [153]. При этом водный экстракт плодового тела ингибирует примерно на 70% опухоль саркомы S-180, привитую на мышах [147].

Полисахариды, выделенные из лесного гриба *D. tricolor*, проявляют антирадикальную, а также противоопухолевую активность на клеточных линиях A-549 (карцинома легких), LoVo (колоректальный рак) и L1210 (лейкоз), при этом концентрация, ингибирующая рост клеток на 50 % (IC₅₀) для данных клеточных линий составила 780, 1050, 440 мкг/мл соответственно [179].

В работе Zhao J.Y. и соавт. описывается культивирование гриба на глюкозопептонной среде состава: глюкоза – 50 г/л; пептон – 1,5 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; калия дигидрофосфат – 0,5 г/л; магния сульфат– 0,5 г/л [228]. Однако при этом сесквитерпены и эгростеролы, выделенные из выращенного мицелия гриба, не показали достоверной цитотоксической активности в отношении клеточных линий MCF-7 (рак молочной железы), ГГМК-7721 (гепатоцеллюлярная карцинома), HL-60 (миелоидной лейкемии человека), SW480 (рак толстой кишки) и A-549 (рак легких).

Литературные данные по биологической активности, проявляемой ксилотрофными базидиомицетами *Daedaleopsis tricolor*, *D. confragosa*, *Fomes fomentarius* приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биологическая активность ксилотрофных базидиомицетов *Daedaleopsis tricolor*, *Daedaleopsis confragosa*, *Fomes fomentarius*

Гриб	Вид сырья	Препарат/ группа БАВ	Активность	Ссылка
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	Плодовое тело	Тритерпены	Антибактериальная, антиоксидантная	[153]
	Плодовое тело	Водный экстракт	Противоопухолевая (в отношении саркомы S-180)	[147]
	Плодовое тело	Полисахариды	Антирадикальная, противоопухолевая (в отношении A-549, LoVo, L1210)	[179]
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Плодовое тело	Водный экстракт	Противовирусная (в отношении вирусов гриппа)	[39; 204]
	Плодовое тело	Этанольный экстракт	Антирадикальная, антиоксидантная	[209]
	Плодовое тело	Метанольный экстракт	Противоопухолевая (в отношении L1210)	[207]
	Мицелий	Водный экстракт	Противовирусная (в отношении вирусов гриппа)	[39; 204]
	Мицелий	Белковая фракция	Противовирусная (в отношении вируса иммунодефицита человека и вируса простого герпеса 2-го типа)	[22]
	Мицелий	Полисахариды	Противоопухолевая (в отношении саркомы S-180 и карциномы Эрлиха на 90 %)	[182]
<i>Fomes fomentarius</i>	Плодовое тело	Водный экстракт	Гипогликемическая, антихолестеринемическая, стимуляция тканевого дыхания	[159]
	Плодовое тело	Этанольный экстракт	Железо-восстанавливающая	[48]
	Плодовое тело	Меланин-глюкановый комплекс	Противовирусная (в отношении ВИЧ-1)	[193]
	Плодовое тело	Микотон*	Противовирусная (в отношении вируса простого герпеса)	[7; 25]
	Мицелий	Полисахариды	Противоопухолевая (в отношении SGC-7901) иммуномодулирующая	[51; 126]
	Мицелий	10 % суспензия биомассы	Противовирусная (в отношении вируса гриппа H1N1)	[60]

Примечание: *состав: хитин 70%, бета-глюканы – 20%, меланины – 10%.

Из таблицы 1 следует, что на настоящее время по грибу *Daedaleopsis tricolor* имеются лишь единичные публикации и только зарубежных авторов. При

этом литературные данные о культивировании гриба *D. tricolor* в настоящее время крайне скудны. Соответственно, *D. tricolor* является наименее изученным видом среди представленных грибов.

Итак, анализ литературных данных показал, что метаболиты дереворазрушающих базидиомицетов *D. tricolor*, *D. confragosa*, *Fomes fomentarius* показывают широкий спектр биологической активности.

При этом препараты природного и биотехнологического происхождения, полученные из этих грибов, представлены в виде: биомассы, экстрактов и отдельных групп БАВ. Однако, все перечисленные препараты, представленные в таблице 1, не зарегистрированы как лекарственные средства на территории Российской Федерации. Данный факт еще раз актуализирует настоящую работу.

1.3 Биотехнология высших базидиомицетов

Получение биомассы мицелия грибов биотехнологическими методами имеет преимущества перед плодовыми телами. К таким преимуществам относятся: экологическая чистота грибных препаратов, независимость от сырьевой базы грибов и возможность влиять на выход и качество конечного продукта путем изменения состава питательных сред и условий культивирования [50].

В настоящее время в Японии производятся полисахаридные препараты, получаемые из культивируемого мицелия дереворазрушающих грибов, такие как Крестин и Шизофиллан.

Японская фирма Sankyo Co Ltd выпускает лекарственное средство Крестин (PSK) на основе биомассы культуры гриба *Trametes versicolor*. Препарат обладает иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями [26; 198]. Препарат Шизофиллан (SPG) получают из культивируемой биомассы базидиомицета *Schizophyllum commune* [157]. Шизофиллан показывает противоопухолевую, иммуномодулирующую и противовирусную активности [217].

Тем не менее, в России на сегодняшний день практически не производят биомассу мицелия базидиомицетов для получения лекарственных препаратов. Мицелий базидиомицетов нарабатывают лишь в лабораторных условиях для исследовательских целей, в том числе для исследований биологической активности метаболитов грибов [51; 111].

При этом другие объекты биотехнологии – дрожжи и бактерии, особенно *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli*, культивируются в промышленных масштабах на биотехнологических производствах в течение многих десятилетий для различных отраслей народного хозяйства [9].

Escherichia coli является универсальным продуцентом широкого спектра различных БАВ: аминокислот, белков (в том числе ферментов), органических кислот, нуклеотидов и многих других [21; 114]. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* широко используется в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции, а также в качестве продуцента витаминов, гормонов, аминокислот, углеводов и других веществ [94; 115]. Кроме того, *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* являются одними из самых важных модельных организмов, применяемых в биотехнологии, микробиологии и генетической инженерии.

Несмотря на то, что высшие базидиомицеты имеют, в целом, более низкую скорость роста на питательных средах по сравнению с бактериями и дрожжами как объекты биотехнологии они обладают следующими преимуществами:

1) способность базидиомицетов синтезировать БАВ, которые не синтезируются или синтезируются в малых количествах дрожжами и бактериями, например, полисахариды (β -глюканы, хитин), пигменты полифенольного ряда (меланины, гуминовые кислоты), тритерпены, сесквитерпены и др.;

2) гифальная структура высших грибов, благодаря которой грибы образуют биомассу; при этом исключается стадия тонкой очистки биомассы и облегчается процесс отделения биомассы от питательной среды.

В настоящее время одним из перспективных направлений современной биотехнологии является использование культур клеток и тканей высших растений, помимо бактерий, дрожжей и высших грибов. Как правило, растения

культивируют в виде каллуса [83]. Однако культивирование биомассы растений ограничено, т.к. биотехнология высших растений имеет целый ряд недостатков:

1) трудоемкость и длительность процессов перевода природных объектов в чистую культуру. Например, для выделения в чистую культуру эксплант, полученный из растения, как правило, подвергают дезинфекции химическим способом, затем для разрушения клеточных стенок эксплант обрабатывают ферментами, такими как целлюлаза и гемицеллюлаза; при этом первичный каллус образуется примерно через 1-2 месяца культивирования транспланта на стерильной питательной среде;

2) медленная в сравнении с бактериями, дрожжами и высшими грибами скорость роста биомассы растительных клеток или тканей твердофазным и глубинным способом; в связи с этим время глубинного культивирования растительной биомассы составляет, как правило, 2-3 недели;

3) высокий процент гибели чувствительных каллусных клеток в процессе культивирования на жидкой среде;

4) способность каллусных клеток к дифференцировке, что затрудняет культивирование каллусной биомассы растений;

5) повышенные требования к стерилизации питательных сред и посуды и к асептическим условиям культивирования;

6) сложность и разнообразие состава питательных сред для выращивания биомассы растений;

7) требование к обязательному наличию в питательной среде сравнительно редких компонентов, таких как фитогормоны, аминокислоты, витамины, цитокинины, ауксины, что приводит к повышению стоимости конечного продукта [83; 101].

Биотехнология высших базидиомицетов не имеет большинства недостатков и ограничений, характерных для биотехнологии растительных клеток и тканей.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что культивирование высших базидиомицетов для биосинтеза активных метаболитов, таких как полисахариды, белки, фенольные соединения, пигменты, тритерпены, имеет

преимущества перед культивированием бактерий, дрожжей и растений. Но при этом грибы являются малоизученным объектом биотехнологии. Следовательно, выращивание в чистой культуре биомассы базидиомицетов является актуальным направлением для разработки новых препаратов.

Среди различных групп высших базидиомицетов существенное внимание уделяется ксилотрофным грибам, т.к. большинство из них относительно легко выделяются в чистую культуру из природных местообитаний, характеризуются быстрым ростом, не требуют сложного состава питательных сред для глубинного и поверхностного культивирования. Кроме того, дереворазрушающие грибы способны утилизировать отходы деревоперерабатывающей промышленности и сельского хозяйства, что связано с наличием ферментов лигнинолитического комплекса [46].

Таким образом, представляется актуальным широкое использование культивируемой биомассы дереворазрушающих грибов для разработки новых лекарственных препаратов, получения продуктов пищевого и кормового назначения и для переработки лигнинсодержащих отходов.

1.4 Характеристика методов выделения биологически активных веществ из высших базидиомицетов

1.4.1 Выделение комплекса биологически активных соединений

Несмотря на многообразие видов сырья, физических и химических свойств извлекаемых соединений, технология выделения БАВ состоит в основном из следующих стадий: подготовка исходного сырья, экстрагирование БАВ из сырья выбранным растворителем, отделение экстракта от сырья, удаление растворителя из экстракта, выделение и очистка биологически активного вещества из экстракта.

Экстракцию природных веществ из растений и грибов осуществляют либо извлечением комплекса содержащихся в них соединений с последующим разделением на отдельные компоненты, либо последовательной экстракцией отдельных соединений или классов соединений. При этом процесс выделения БАВ экстракцией обладает значительными экономическими преимуществами.

Существуют разные методы экстрагирования: статическая мацерация, динамическая мацерация с перемешиванием, дробная мацерация, перколяция, реперколяция, противоточная экстракция, циркуляционная экстракция, вихревая экстракция, ультразвуковая экстракция [82; 83].

1.4.2 Выделение веществ первичного метаболизма

1.4.2.1 Выделение полисахаридов

Полисахариды из грибного материала выделяют с использованием комбинации технологий. К таким технологиям относятся: осаждение этанолом и уксусной кислотой, фракционное осаждение, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и аффинная хроматография.

Метод разделения полисахаридов включает в себя элиминацию низкомолекулярных соединений из сырья под действием 80% этанола, после чего проводят три последовательных экстракции: водой, 2% раствором оксалата аммония и 5% раствором натрия гидроксида [218]. Полисахариды из грибного материала также выделяют экстракцией щелочами [16].

Для выделения полисахаридов клеточной стенки грибов – хитина и хитозана – применяют метод кислотно-щелочного гидролиза, заключающийся в том, что сырье на первом этапе депротеинируют щелочью, на втором проводят деминерализацию сырья кислотой, а на третьем сырье подвергают дезацетилированию гидроксидом натрия [23]. Другой способ получения хитозана заключается в обработке 10% и 30% растворами гидроксида натрия без стадии деминерализации [98].

Известен способ получения хитинсодержащего препарата: измельченные плодовые тела гриба *Fomes fomentarius* обрабатывают щелочью, затем промывают водой, обрабатывают полученную волокнистую массу органическими растворителями, хитинсодержащий материал разрыхляют и высушивают под вакуумом. Полученный таким способом препарат Микотон содержит хитина 70%, бета-глюканов (β -1,3 и β -1,6-глюканы) – 20%, меланиновых пигментов – 10% [97].

1.4.2.2 Выделение белков

Выделение белков из базидиальных грибов, в большинстве случаев, сводится к получению водного экстракта из гриба, осаждению сульфатом аммония, перерастворению в воде, диализу против воды, и при необходимости разделению белков на разные фракции хроматографическими методами [16; 185]. Кроме сульфата аммония для осаждения белков также используют: трихлоруксусную кислоту, соли тяжелых металлов, органические растворители и др. [231].

1.4.3 Выделение веществ вторичного метаболизма

1.4.3.1 Выделение тритерпенов

В большинстве случаев для выделения тритерпенов получают суммарный экстракт путем обработки сырья метанолом, этанолом, водой или хлороформом [29; 73]. Тритерпены осаждают этиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, иногда изоамиловым спиртом. Полученные фракции, содержащие тритерпены, растворяют и очищают переосаждением.

Значительное распространение нашли хроматографические методы очистки сапонинов. Гликозиды, содержащие свободные карбоксильные группы, могут быть отделены от сопутствующих веществ, в том числе и от минеральных примесей, с помощью ионообменной хроматографии [29].

Тритерпены из *Ganoderma lucidum* получают путем добавления $\frac{1}{4}$ части этилового спирта к водному экстракту и проводят фильтрацию осажденных водонерастворимых соединений. Полученный фильтрат выпаривают, высушивают, растворяют сухой остаток в воде и проводят дальнейшее разделение методом гель-фильтрационной хроматографии [169].

1.4.3.2 Выделение каротиноидов

Каротиноиды выделяют экстракцией хлороформом, гексаном [74; 106] ацетоном [31; 61], смесью гексан – хлороформ (1:1) [69], смесью гексан – ацетон (1:1) [69], смесью Фолча, содержащей хлороформ и метанол (2:1) [61].

Известен способ выделения каротиноидов, заключающийся в том, что сырье экстрагируют 96% этанолом, а затем 4-5 кратно обрабатывают гексаном. Этанольный и гексановые извлечения объединяют и прибавляют воду. Смесь, содержащую этанольный экстракт, гексановый экстракт и воду дистиллированную, перемешивают, а затем отстаивают или центрифугируют. Верхний слой представляет собой гексановый экстракт, содержащий каротиноиды, а нижний – водно-этанольную смесь [95].

Существует также другой метод выделения каротиноидов, включающий предварительное омыление сырья 5% спиртовым раствором щелочи, обработку сырья гексаном до получения бесцветных гексановых растворов, сушку гексанового экстракта безводным натрием сульфатом, фильтрацию, концентрирование гексанового экстракта, колоночную хроматографию сгущенного экстракта с использованием оксида алюминия (III) и элюирование каротиноидов смесью гексан – ацетон (1:1) [1].

1.4.3.3 Выделение меланинов

Меланиновые пигменты выделяют из грибов обычно с помощью обработки сырья водным раствором гидроксида натрия в концентрациях от 0,04% до 50% [4; 15; 100]. Процесс проводят при температуре от 20 °С до 95 °С [15; 100]. Далее щелочной фильтрат подкисляют соляной кислотой для осаждения меланинов. Выпавший осадок очищают переосаждением кислотой [4; 15] или переводят в водорастворимую форму, растворяя в аммиаке водном с последующим выпариванием аммиака и воды.

1.4.3.4 Выделение фенольных соединений

Для выделения фенольных соединений, в том числе флавоноидов, из природного материала, как правило, используют экстракцию этиловым или метиловым спиртом в концентрации 40, 70 или 96% [29], а также этилацетат. Разделение фенольных соединений осуществляют хроматографическими методами (адсорбционная хроматография на полиамиде, силикагеле, целлюлозе;

бумажная хроматография; высокоэффективная жидкостная хроматография) [29; 108], методом капиллярного электрофореза [99].

Известен способ получения хиспидина (6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2-пирона), представляющего собой гликозид 3,4-дигидроксистирила, из грибного материала, заключающийся в том, что сырье трехкратно обрабатывают этилацетатом, затем объединенное этилацетатное извлечение выпаривают в вакууме и проводят перекристаллизацию соединения ацетоном [152].

Методы выделения из природного сырья определенных групп БАВ используются как для получения препаратов, так и для качественного и количественного анализа БАВ.

Разнообразие биохимического состава высших грибов увеличивает спектр биологической активности препаратов на их основе. Проведенный анализ существующих методов выделения показал, что оптимальным и простым методом выделения комплекса БАВ из базидиомицетов является экстракция.

1.5 Методические подходы к анализу выделенных групп биологически активных соединений

1.5.1 Анализ веществ первичного метаболизма

1.5.1.1 Анализ на полисахариды

Количественная оценка на содержание полисахаридов является одной из обязательных характеристик экстрактов высших грибов. Для анализа содержания полисахаридов используют гравиметрический метод, фенол-серноокислый метод, антроновый метод и др.

Гравиметрический метод оценки содержания полисахаридов в сырье заключается в осаждении данной группы природных соединений из водных извлечений трехкратным объемом спирта этилового 95%-ного [28]. К недостаткам данного способа, несмотря на его универсальность, следует отнести: длительность, низкую специфичность, низкую точность, обусловленную соосаждением сопутствующих веществ белковой, минеральной и фенольной природы [75; 90].

Существует ряд методов, основанных на кислотном гидролизе полисахаридов с последующим образованием окрашенных продуктов реакции в присутствии кислородсодержащих фенолов.

Например, фенол-серноокислый метод [132] заключается в том, что углеводы в присутствии фенола и серной кислоты дают окрашенные продукты, максимум поглощения которых находится в области длин волн 480-490 нм. К недостаткам данного метода относятся трудности при работе с фенолом, связанные с его высокой токсичностью и необходимостью расплавления твердого фенола перед подготовкой реактива.

В классическом варианте антронового метода Дрейвуда в результате взаимодействия оксиметилфурфурола, образующегося в результате дегидратации моносахаридов, и антрона в среде концентрированной серной кислоты образуются продукты конденсации сине-зеленого цвета с максимумом спектра поглощения в интервале длин волн 520-625 нм [55]. Однако при этом относительная ошибка определения в эксперименте со стандартными образцами

веществ (пентозы, гексозы, олигосахариды и полимерные соединения) может достигать 10%, которая обусловлена вязкостью концентрированной серной кислоты, мешающей равномерному распределению окрашенных продуктов в объеме пробы. Для устранения этих недостатков реакционную смесь разводят спиртом этиловым. При этом образуются растворы желтого цвета удовлетворительной вязкости, максимум поглощения которых смещается в интервал длин волн 428-431 нм [76].

Таким образом, модифицированный антроновый метод является наиболее приемлемым для анализа полисахаридов в препаратах, полученных из грибного сырья.

1.5.1.2 Анализ на белки

Для количественной оценки содержания общего белка в образцах используют различные методы, такие как спектрофотометрия [27], фотоколориметрия [27] и масс-спектрометрия [53].

Спектрофотометрический метод основан на измерении светопоглощения растворов, содержащих белки, при длине волны 280 нм или в интервале длин волн 205-220 нм. Однако данный метод непригоден для анализа содержания белка в неочищенных препаратах, таких как экстракты грибов [27].

Среди фотоколориметрических методов анализа белка выделяют биуретовый метод, метод Лоури и метод Брэдфорд.

Биуретовый метод анализа основан на образовании биуретового комплекса (имеет фиолетовый цвет) пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди. В методе используют биуретовый реактив, состоящий из гидроксида калия, сульфата меди и цитрата (или тартрата) натрия. В образовавшемся комплексе медь связана с 4-мя атомами азота координационными связями, а с 2-мя атомами кислорода – электростатическими. Полноценный комплекс образуется лишь с пептидами, состоящими более чем из 4 остатков. Оптическую плотность раствора определяют в интервале длин волн 540-560 нм. К достоинствам метода относятся

специфичность, невысокую погрешность, к недостаткам – низкая чувствительность (2-10 мг/мл) [32].

Метод Лоури заключается в том, что в щелочной среде ионы Cu (II) образуют комплекс с пептидными связями, переходя в Cu (I), при этом одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина (фосфомолибденовая кислота с фенолом), образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь, с максимумом адсорбции при длине волны 750 нм. Увеличение адсорбции при длине волны 750 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей, что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах. Чувствительность метода составляет 10-100 мкг/мл [172].

Метод Брэдфорд основан на реакции красителя Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при длине волны 595 нм. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью. В интервале концентраций белка от 2 мкг/мл до 120 мкг/мл наблюдается линейная зависимость увеличения оптической плотности от концентрации [123].

Итак, для анализа на содержание белка в препаратах из высших грибов наиболее приемлемым является метод Бредфорд.

1.5.2 Анализ веществ вторичного метаболизма

1.5.2.1 Анализ на фенольные соединения

В настоящее время известны разные методы количественного определения фенольных соединений в фитопрепаратах. К ним относятся: титриметрический метод Левенталя, гравиметрический метод Дейса и спектрофотометрический метод с использованием реактива Фолина-Чикольте.

Недостатками гравиметрического метода Дейса, основанного на определении продуктов взаимодействия с избытком формальдегида [10], являются низкая точность, увеличение погрешности метода с уменьшением

концентрации фенольных веществ, наличие в растворе низкомолекулярных продуктов, влияющих на результат измерения. Следует отметить что, для проведения реакции используются значительные количества токсичного формальдегида [105].

Метод Левенталья, основанный на окислении фенольных соединений перманганатом калия с использованием индигокармина в качестве индикатора [110], имеет сравнительно хорошую точность и воспроизводимость, заключающуюся в титровании растворов экстрактов перманганатом калия в присутствии индигокармина в качестве индикатора. К недостаткам метода следует отнести субъективность определения конца титрования по появлению золотисто-желтой окраски, зависимость результатов от интенсивности перемешивания титруемого раствора и от освещения и зависимость расхода перманганата калия от скорости титрования [105].

В последнее время широкое применение находит спектрофотометрическое определение соединений фенольного ряда. Метод Фолина-Чикольте основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота [196]. Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя. В большинстве случаев используют смесь фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот (реактив Фолина-Чикольте). В щелочной среде эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, интенсивность окраски которых оценивается спектрофотометрически [183].

Таким образом, из рассмотренных методов анализа фенольных соединений наиболее чувствительным и специфичным является фотоколориметрический метод с использованием реактива Фолина-Чикольте.

1.5.2.2 Анализ на флавоноиды

Флавоноиды, как вторичные метаболиты, в тех или иных количествах содержатся практически во всех растениях. Эти вещества обнаружены и в

некоторых высших грибах. Однако публикаций по изучению флавоноидов в грибах сравнительно мало [209], в то время как количество публикаций по исследованиям качественного и количественного состава флавоноидных соединений в высших растениях постоянно растет [42; 64; 65; 89; 105; 109; 113].

Для количественного анализа различных групп флавоноидов используются как классические (гравиметрия и титриметрия), так и инструментальные (фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, денситометрия, полярография, амперометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография) методы [57].

Фотоколориметрические методы анализа флавоноидов основаны на реакциях комплексообразования флавоноидов с солями различных металлов (алюминия, хрома, сурьмы), с борной кислотой в присутствии лимонной кислоты, калия гидроксидом, уранилом, и на реакции восстановления цинком или магнием в кислой среде [57].

Реакции комплексообразования флавоноидов с солями металлов широко используются для анализа содержания флавоноидов в объектах природного происхождения, т.к. они проявляют высокую специфичность по отношению к флавоноидам. При этом образуются окрашенные соединения, имеющие флуоресценцию, и наблюдается батохромный сдвиг [8; 57]. Аллюминия хлорид является распространенным и доступным комплексообразователем для количественного анализа флавоноидов. Поэтому количественный анализ флавоноидов во многих случаях проводят с помощью реакции комплексообразования с хлоридом алюминия [8; 34; 64; 65; 145].

Метод Лоренца и Арнольда основан на измерении плотности буро-красной окраски, образующейся при нагревании флавоноидов с калия гидроксидом. Однако данный метод не является высокоспецифичным, поскольку антрацены и моносахариды также способны реагировать с гидроксидом калия [57].

Количественное определение флавоноидов с помощью цианидинового реактива основано на восстановлении флавонов водородом, выделяющимся при взаимодействии магния в спиртовой среде в присутствии соляной кислоты. Реакция сопровождается оранжевым или малиновым окрашиванием [29; 57].

Для количественного анализа флавоноидов используется и реакция с борной кислотой, дающая в растворе сухого ацетона желтое окрашивание при наличии орто-диоксигруппировки в структуре флавоноидных молекул [38; 54].

Итак, для анализа содержания флавоноидов в препаратах природного происхождения выбран фотоколориметрический метод, основанный на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия, проявляющей высокую специфичность в отношении флавоноидов.

1.5.2.3 Анализ на каротиноиды

Анализ на содержание каротиноидов в объектах природного происхождения в подавляющем большинстве случаев включает следующие этапы: выделение каротиноидов из образцов и спектрофотометрический анализ полученного раствора.

Методики анализа каротиноидов отличаются лишь по виду экстрагента, способу выделения каротиноидов из сырья и длине волны, при которой измеряют оптическую плотность извлечений.

Методы выделения каротиноидов из сырья рассмотрены в п. 1.4.5. Спектральные измерения растворов проводят в диапазоне длин волн от 350 до 750 нм, т.к. в этом диапазоне длин волн лежат максимумы поглощения каротиноидов [61], что обусловлено полиеновой структурой этих веществ. Максимумы светопоглощения каротиноидов варьируют в зависимости от длины полиенового фрагмента, наличия в структуре циклических концевых групп, стерических эффектов, природы используемого растворителя [12].

Таким образом, для анализа содержания каротиноидов в препаратах грибного происхождения следует выбрать селективный метод выделения, предложенный С.П. Кудиновой [95].

Заключение по литературному обзору

Анализ литературных данных показал, что метаболиты ряда видов высших базидиомицетов обладают высокой биологической активностью: противоопухолевой, антиоксидантной, иммуномодулирующей и противовирусной. В работах доказана перспективность высших базидиомицетов для разработки новых лекарственных препаратов, т.к. базидиальные грибы способны синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, таких как полисахариды, протеины, фенольные соединения, меланины и др., проявляющих антиоксидантную, противоопухолевую, иммуномодулирующую, противовирусную активность.

Используя классические и современные методы и технологии, исследователи научились выделять из базидиальных грибов фармакологически активные вещества, такие как полисахариды, белки, терпены, фенольные соединения, в том числе флавоноиды, меланины и каротиноиды.

Анализ методов выделения различных классов веществ показал определенный прогресс в выделении индивидуальных веществ из сырья природного происхождения. Но все эти работы чаще всего имеют исследовательский интерес, т.к. выделение индивидуальных веществ является нерентабельным вследствие очень низкого выхода продукта в пересчете на исходное сырье. Следует также отметить, что именно сложность и многообразие химического состава базидиомицетов обуславливают их широкий спектр действия на организм человека.

Поэтому для производства лекарственных средств выделение индивидуальных веществ из высших базидиомицетов является как нерентабельным, так и нелогичным. Таким образом, для промышленного производства лекарственных препаратов природного происхождения следует разработать технологию извлечения комплекса БАВ без разделения их на индивидуальные вещества.

Стандартизация лекарственных средств является основным гарантом их высокого качества при серийном производстве и обеспечивает эффективность и

безопасность применения. Управление качеством достигается путем осуществления совокупности мероприятий, методов и средств, которые обеспечивают и поддерживают качество лекарственных препаратов. В связи с тем, что метаболиты грибов определяют биологическую активность разрабатываемых препаратов природного происхождения, характеристика экстрактов на содержание групп БАВ, таких как полисахариды, белки, каротиноиды, тритерпены, фенольные соединения и флавоноиды, является одним из этапов стандартизации разрабатываемых биологических препаратов природного и биотехнологического происхождения.

В результате проведенного литературного поиска по методам анализа групп БАВ в объектах природного происхождения были выбраны методы количественного анализа полисахаридов, белков, каротиноидов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из высших базидиомицетов.

Для количественного анализа полисахаридов в препаратах, полученных из грибного сырья, выбран модифицированный антроновый метод, для анализа содержания белков – метод Бредфорд, для анализа фенольных соединений – фотоколориметрический метод Фолина-Чикольте, для анализа флавоноидов – фотоколориметрический метод, основанный на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия, для анализа каротиноидов – спектрофотометрический метод.

Ксилотрофные грибы *Daedaleopsis tricolor*, *D. confragosa* и *Fomes fomentarius* являются потенциальными источниками разрабатываемых лекарственных препаратов. При этом *D. tricolor* является наименее изученным видом среди представленных грибов.

Биотехнологический процесс культивирования базидиомицетов является перспективным способом получения сырья для создания лекарственных препаратов, обладающих широким спектром биологической активности. Следует отметить, что биотехнологические аспекты культивирования высших грибов в России развиты заметно меньше, чем биотехнологические аспекты культивирования бактерий, дрожжей и растений.

Введение в чистую культуру новых штаммов высших базидиомицетов является перспективным для создания продуцентов БАВ, обладающих антиоксидантной, противоопухолевой, иммуномодулирующей, противовирусной активностью.

В Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ Вектор сотрудниками лаборатории микологии депонированы штамм *Daedaleopsis confragosa* К-116 и штамм *Fomes fomentarius* Кр-112. Штаммы-продуценты гриба *Daedaleopsis tricolor* на 2013 год отсутствуют. Литературные данные о биотехнологических аспектах применения *D. tricolor* в настоящее время практически отсутствуют.

Таким образом, стратегия разработки экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов включает следующие этапы: разработку и апробирование технологии выделения комплекса БАВ; введение в культуру гриба *D. tricolor*; оптимизацию условий культивирования *D. tricolor*; анализ физико-химических параметров экспериментальных образцов препаратов, полученных из диких плодовых тел и культивируемого мицелия гриба в виде сухих экстрактов; тестирование биологической активности экстрактов гриба.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Объекты

В качестве объектов исследования использовали плодовые тела и культивируемый мицелий высших грибов.

2.1.1.1 Объекты природного происхождения

Плодовые тела грибов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius*. Плодовые тела *D. tricolor* собраны в разное время в нескольких местах: 1) в августе 2013 г. близ села Вьюны Новосибирской области; 2) в сентябре 2013 г. в окрестностях поселка Кольцово Новосибирской области. Плодовые тела *F. fomentarius* собраны летом в 2011 и 2012 гг. в Караканском бору Новосибирской области.

2.1.1.2 Объекты биотехнологического происхождения

1) Биомасса мицелия *Daedaleopsis tricolor* получена путем культивирования штаммов-продуцентов Db-14, Db-18 и Dr-17. Штаммы выделены из плодовых тел, собранных близ села Вьюны в августе 2013 г и из плодовых тел, собранных в р.п. Кольцово в 2013 г. Культивирование проводили на ротационной качалке термостатированной КТ-104 № 48/10 при 190 об./мин, температуре 26 ± 2 °C, в течение 5-7 суток в жидких питательных средах. Состав питательных сред указан в п. 2.2.3.

2) Биомасса мицелия *Fomes fomentarius* Кр-112 получена путем культивирования на ротационных качалках при скорости 160 об./мин, температуре 26 ± 2 °C, в течение 10 суток в жидкой питательной среде. Состав питательной среды: кукурузная мука – 53 г/л; пептон – 3,2 г/л; K_2HPO_4 – 2,6 г/л; MgSO_4 – 0,2 г/л; CaCl_2 – 0,1 г/л. Объем полученной биомассы составил 5 л. Выход сухого мицелия составил 2,9 г/л. В сумме сухая биомасса составила 14,5 г. *F. fomentarius* Кр-112 (F-1261) был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории микологии. Штамм депонирован в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в 2012 г. под номером F-1261.

2.1.2 Культуры клеток

Для тестирования цитотоксичности и противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов из высших грибов использовали перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клеток почки собаки кокер-спаниеля (MDCK), полученные из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Монослои клеток Vero выращивали с использованием среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной сыворотки («HyClone», США). В лунки 96-луночных планшетов вносили по 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 2×10^5 кл./мл, в лунки 24-луночных планшетов – по 1 мл с концентрацией 1×10^5 кл./мл. Для получения монослоев клеток MDCK использовали 96-луночные планшеты, в лунки которых вносили по 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией 1×10^5 кл./мл в среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с антибиотиками и 5 % эмбриональной сыворотки («HyClone», США). Планшеты с культурами клеток помещали в термостат на 2-4 суток до образования монослоя при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100 % влажности.

Для тестирования противоопухолевой активности экспериментальных образцов препаратов использовали перевиваемую культуру клеток карциномы гортани человека (Нер-2), полученную из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Для выращивания клеток Нер-2 использовали среду Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови («HyClone», США). Культуральные флаконы с клетками и средой помещали в термостат на 24 часа при температуре 37 °С.

2.1.3 Вирусы

В работе использовали вирус простого герпеса 2-го типа (штамм MS), вирус осповакцины (штамм Л-ИВП) и вирус гриппа А: штаммы A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Вирусы простого герпеса и осповакцины

нарабатывали и титровали в культуре клеток Vero в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия), вирус гриппа – в культуре клеток MDCK в среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия). В качестве поддерживающей среды при культивировании клеток Vero с ВПГ-2 и ВОВ использовали питательную среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с 2% эмбриональной сыворотки («HyClone», США). При культивировании клеток MDCK с вирусом гриппа использовали поддерживающую питательную среду RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия), содержащую 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США), без эмбриональной сыворотки.

Концентрацию вирусов простого герпеса и гриппа в используемых для работы образцах определяли путем титрования в соответствующей культуре клеток (Vero или MDCK), рассчитывали по методу Спирмена-Кербера и выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл (\lg ТЦД₅₀/мл) [37]. Концентрацию вируса осповакцины определяли методом бляшек (негативных колоний) при титровании образцов в культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в мл (\lg БОЕ/мл) [175]. Полученные титры вирусов представляли в виде $M \pm S_m$, где M – среднее значение, S_m – стандартное отклонение [37].

Концентрация вируса гриппа субтипов А/Н3N2 и А/Н5N1 в используемых для работы образцах составляла $7,50 \pm 0,00$ и $7,33 \pm 0,53 \lg$ ТЦД₅₀/мл соответственно, концентрация вирусов простого герпеса 2-го типа и осповакцины в образцах была соответственно $4,50 \pm 0,00 \lg$ ТЦД₅₀/мл и $6,24 \pm 0,02 \lg$ БОЕ/мл. Нарботанные и использованные в работе образцы вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) хранили при температуре минус 70 °С.

2.2 Методы

Программа разработки технологии экспериментальных образцов препаратов на основе высших базидиомицетов представлена на рисунке 1.

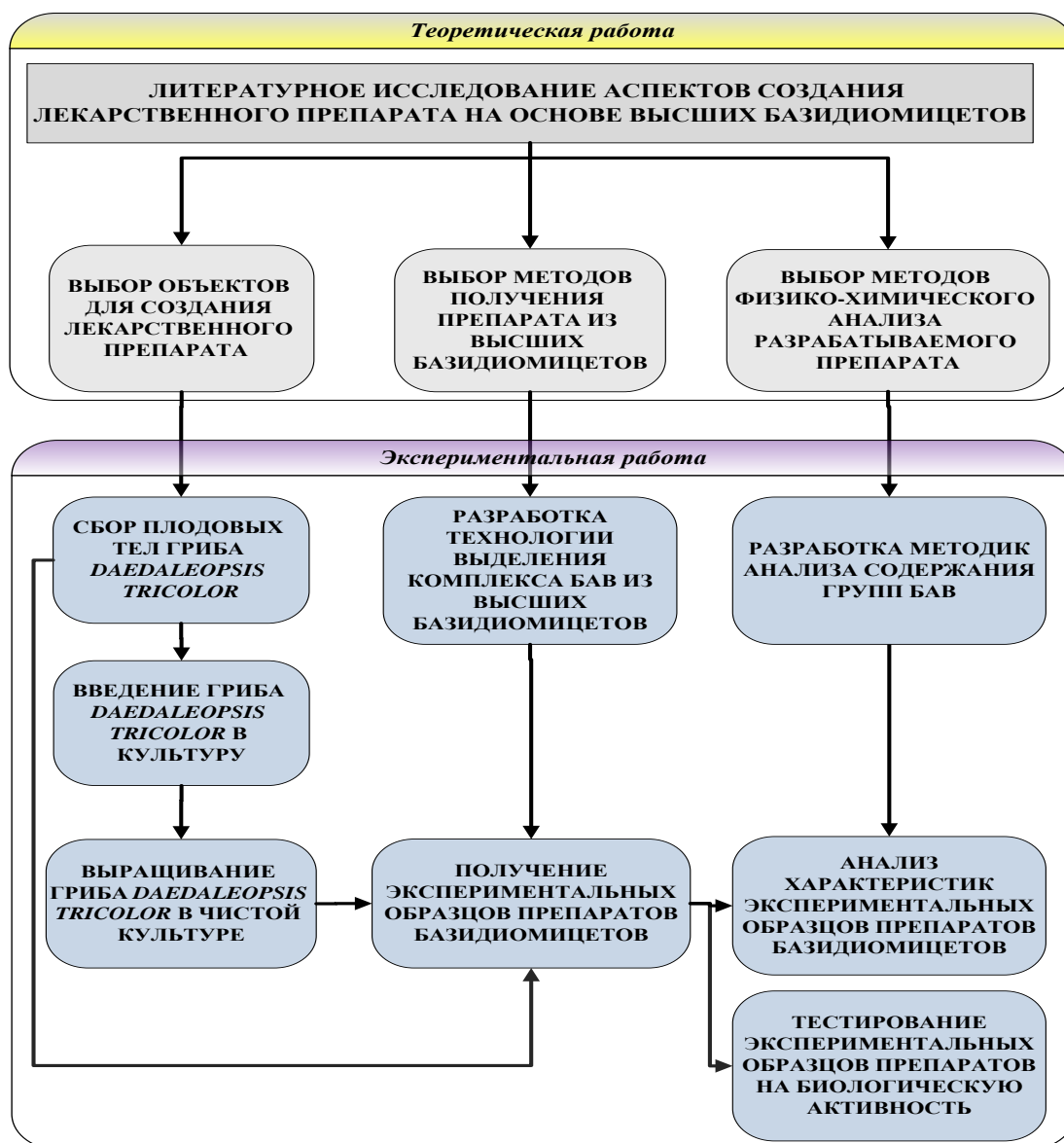


Рисунок 1 – Программа разработки технологии экспериментальных образцов препаратов

Этапы экспериментальной работы:

- 1) разработка универсальной технологии выделения комплекса БАВ из грибного сырья;
- 2) введение в чистую культуру новых штаммов базидиомицетов;
- 3) наработка биомассы мицелия высших базидиомицетов;
- 4) получение экспериментальных образцов препаратов базидиомицетов;
- 5) разработка методик физико-химического анализа экспериментальных образцов препаратов;

- 6) анализ характеристик экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов;
- 7) тестирование биологической активности экспериментальных образцов препаратов *in vitro*.

2.2.1 Подготовка природного сырья для работы

Плодовые тела высших базидиальных грибов собраны автором из природных мест обитания Новосибирской области. Использовались также грибы, собранные сотрудниками лаборатории низших растений ЦСБС СО РАН. Идентификацию видов проводили по определителям Арефьева и Бондарцева [2; 11] при консультации специалистов лаборатории микологии ГНЦ ВБ «Вектор» и лаборатории низших растений ЦСБС СО РАН. Плодовые тела грибов очищали от остатков почвы, травы и листьев. Далее грибы сушили на воздухе в защищенном от света месте при комнатной температуре и измельчали до размеров не более 0,5 см. После этого грибы измельчали на мельнице ИКА® WERKE MF-10 до порошкообразного состояния для получения частиц размером до 1 мм.

2.2.2 Выделение комплекса БАВ из высших базидиомицетов

Для выделения комплекса БАВ из высших грибов использовали методы экстракции водой дистиллированной и водно-этанольными смесями.

2.2.2.1 Получение спиртовых извлечений

Разработанная методика получения сухого этанольного экстракта из грибов описана в п. 3.1.1. Экстракцию водно-этанольными смесями из грибного сырья проводили мацерацией и дробной мацерацией с использованием в качестве экстрагента спирта этилового различной концентрации. При этом варьировали температуру экстракции, концентрацию экстрагента, соотношение сырья к экстрагенту и общее время. При разработке технологии получения спиртового экстракта из высших базидиомицетов в качестве модельной системы

использовали измельченные плодовые тела гриба *Fomes fomentarius*, используя многофакторное планирование эксперимента.

2.2.2.2 Получение водных извлечений

Разработанная автором методика получения водных сухих экстрактов из высших базидиомицетов приведена в п. 3.1.2. Экстрагирование БАВ водой дистиллированной из сырья проводили, варьируя температуру и общее время. В качестве модельной системы использовали измельченные плодовые тела гриба *Fomes fomentarius*.

2.2.3 Введение в культуру гриба *Daedaleopsis tricolor*

Выделение гриба в чистую культуру проводили тканевым методом. Перед выделением плодовое тело гриба очищали от прилипших растительных остатков, быстро промывали в проточной и стерильной воде, а также обрабатывали этилов. Далее обработанное плодовое тело разламывали, и кусочек «ткани» из середины стерильным скальпелем переносили на питательную среду. Кусочки плодового тела помещали сверху на агар в чашки Петри или частично погружали в агаризованную среду. Для очистки культуры от микофильных микромицетов проводили серию пересевов с одной чашки на другую [71]. Схема введения в культуру гриба *Daedaleopsis tricolor* представлена на рисунке 2.

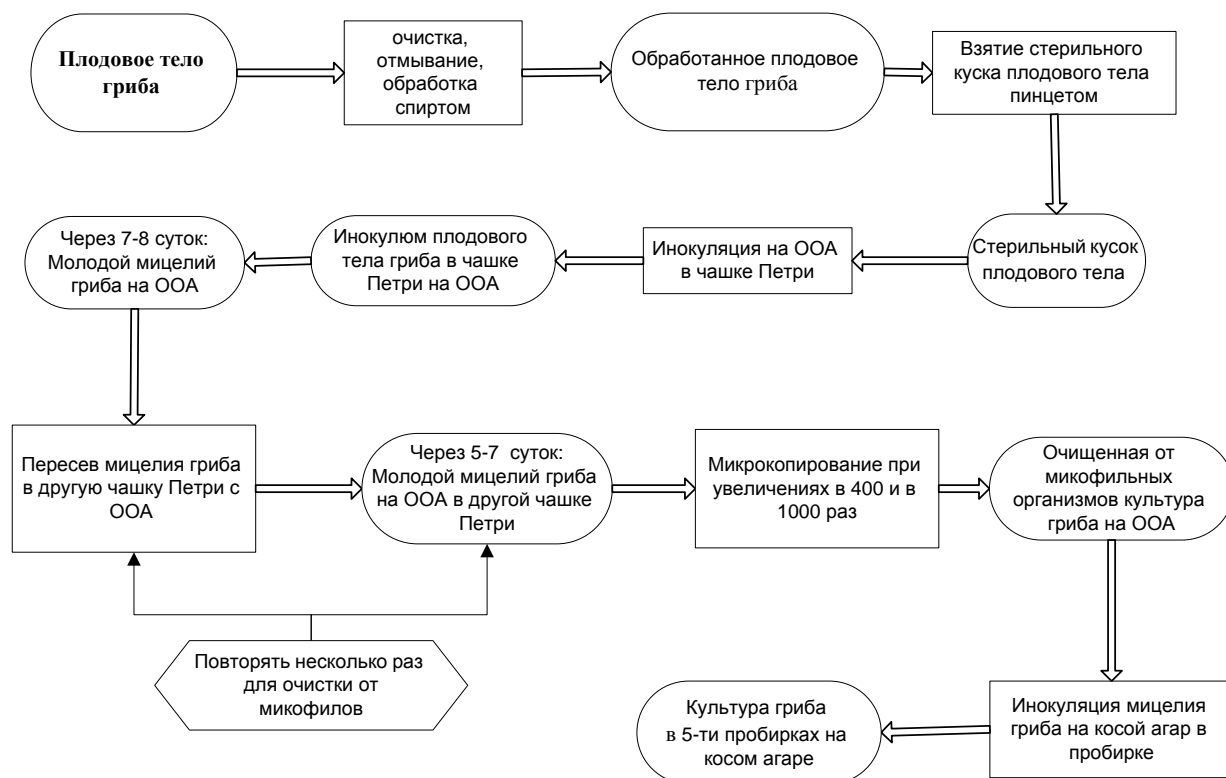


Рисунок 2 – Схема введения в культуру гриба *Daedaleopsis tricolor*

Для введения в культуру гриба *Daedaleopsis tricolor*, очистки культуры от микобфильных организмов, хранения в коллекции, наработки посевного твердофазного мицелия для последующего культивирования на жидких питательных средах использовали следующие питательные среды: овсяной отвар агаризованный (ООА); среду, содержащую картофель, глюкозу и агар (КГА); среду, содержащую мелассу, кукурузный экстракт и агар (МКА) [14].

Ниже приведены методики приготовления питательных сред для культивирования гриба *Daedaleopsis tricolor*:

1) Овсяной отвар агаризованный (ООА)

Состав среды: овес – 30 г/л; агар – 20 г/л. Приготовление среды: овес измельчали на кофемолке, смешивали с водой дистиллированной. Смесь кипятили на медленном огне в течение 1,5 ч. После этого смесь (не фильтруя) оставляли на ночь при комнатной температуре. Жидкость отделяли от осадка путем процеживания, доводили водой дистиллированной до номинального объема и добавляли агар. Смесь стерилизовали в автоклаве DGM-200 при температуре 122 °С и 1,2 атм. в течение 40 мин.

2) Картофельно-глюкозный агар (КГА)

Состав среды: картофель – 200 г/л; глюкоза – 10 г/л; агар – 20 г/л. Приготовление среды: очищенный и омытый картофель, нарезанный ломтиками, варили 30 мин в воде дистиллированной. Полученную смесь отфильтровывали, а затем доводили водой до номинального объема и добавляли агар. Смесь стерилизовали в автоклаве при температуре 116 °С и 0,7 атм. в течение 50 мин.

3) Среда с мелассой и кукурузным экстрактом агаризованная (МКА)

Состав среды: меласса – 40 г/л; кукурузный экстракт – 15 г/л; K_2HPO_4 – 1 г/л; MgSO_4 – 0,3 г/л; агар – 20 г/л. Приготовление среды: свекловичную мелассу, кукурузный экстракт и соли растворяли в воде дистиллированной, затем добавляли агар. Стерилизовали при температуре 116 °С и 0,7 атм. в течение 50 мин.

Для выращивания гриба в поверхностной и глубинной культуре использовали жидкие питательные среды: глюкозопептонную среду (ГПС) [14; 91; 228]; среду с крахмалом и кукурузным экстрактом (ККЭ) [92]; среду с глюкозой и соевой мукой (ГС) [6; 96].

1) Глюкозопептонная среда (ГПС)

Состав среды: глюкоза – 30,0 г/л; пептон – 5,0 г/л; дрожжевой экстракт – 2,0 г/л; K_2HPO_4 – 1,0 г/л; MgSO_4 – 0,5 г/л [58]. Приготовление среды: глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт и неорганические соли растворяли в воде дистиллированной. Стерилизовали при температуре 116 °С и 0,7 атм. в течение 50 мин.

2) Среда с крахмалом и кукурузным экстрактом (ККЭ)

Состав среды: крахмал – 45 г/л, кукурузный экстракт – 15 г/л, K_2HPO_4 – 0,5 г/л, K_2HPO_4 – 0,5 г/л, MgSO_4 – 0,25 г/л. Приготовление среды: крахмал, кукурузный экстракт и неорганические соли растворяли в воде дистиллированной. Стерилизовали при температуре 120 °С и 1,1 атм. в течение 45 мин.

3) Среда с глюкозой и соевой мукой (ГС)

Состав среды: глюкоза – 30 г/л; соевая мука – 15 г/л; KH_2PO_4 – 2 г/л; MgSO_4 – 0,3 г/л. Приготовление среды: глюкозу и неорганические соли растворяли в воде дистиллированной. Затем вводили соевую муку. Смесь нагревали на водяной бане 45 мин при температуре 60 °С. Фильтровали через капроновый фильтр. Стерилизовали при температуре 116 °С и 0,7 атм. в течение 50 мин.

2.2.4 Пробоподготовка образцов для анализа биохимического состава и биологической активности

Подготовка проб экспериментальных образцов препаратов для проведения качественного и количественного анализа и тестирования биологической активности является важным подготовительным этапом.

2.2.4.1 Подготовка проб для анализа биохимического состава

Для анализа биохимического состава готовили растворы экспериментальных образцов препаратов в концентрации 5 мг/мл. Для этого в микропробирку помещали 20 мг экспериментального образца препарата, прибавляли 1 мл растворителя, препарат в растворителе растирали стеклянной или тефлоновой палочкой, затем прибавляли оставшиеся 3 мл того же растворителя. Смесь выдерживали в термостате ТС-1/80 СПУ при температуре 40-60 °С в течение 30-60 мин, затем центрифугировали при 6-8 тыс. об./мин в течение 15-20 мин.

Для анализа белков и полисахаридов, готовили водный раствор экспериментального образца препарата, в то время как для пробоподготовки для анализа содержания фенольных соединений, флавоноидов и тритерпенов использовали 96% этиловый спирт в качестве растворителя.

2.2.4.2 Подготовка образцов для тестирования биологической активности

Подготовку проб для анализа антиоксидантной активности проводили, как описано в п. 2.2.4.1. При этом для анализа железо-восстанавливающей способности экспериментальные образцы препаратов базидиомицетов растворяли

как в этиловом спирте, так и в воде дистиллированной, а для анализа антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 в качестве растворителя использовали воду дистиллированную.

Для анализа противоопухолевой и вируснейтрализующей активности готовили раствор препаратов в питательной среде в концентрации 5 мг/мл. Для тестирования противоопухолевой активности использовали среду Игла MEM, а для анализа противовирусной активности – среду RPMI-1640 и DMEM.

К 20 мг экспериментального образца грибного препарата прибавляли 1 мл питательной среды, препарат растирали стеклянной или тефлоновой палочкой, затем прибавляли оставшиеся 3 мл того же растворителя. Смесь выдерживали в термостате при температуре 30-36 °С в течение 60-80 мин. Затем смесь центрифугировали при 5-6 тыс. об./мин. в течение 15-20 мин. Далее супернатант отделяли от осадка. Супернатант подвергали стерилизующей фильтрации через мембранные фильтры Millipore с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм последовательно.

2.2.5 Методы физико-химического анализа

Содержание экстрактивных веществ сырья, золу общую и влажность образцов определяли фармакопейными методами [27; 28].

2.2.5.1 Качественный анализ экспериментальных образцов препаратов на тритерпены, каротиноиды и флавоноиды

Для качественного обнаружения флавоноидных соединений в экспериментальных образцах препаратов грибов применяли качественные реакции с раствором гидроксида натрия, хлорида алюминия, хлорида железа [29; 57]. В реакции с хлоридом железа в присутствии флавоноидов образуется зеленое, синее или сине-фиолетовое окрашивание [57]. Флавоноиды с раствором гидроксида натрия образуют желто-оранжевое окрашивание [8]. Кроме того, флавоноиды дают окрашенные комплексы желтого цвета с раствором хлорида алюминия [29; 57].

Качественный анализ тритерпенов, каротиноидов и флавоноидов также проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ).

В качестве стандартных образцов для анализа методом ТСХ флавоноидов использовали рутин ГСО, дигидрокверцетин ГСО и лютеолин-7-гликозид ГСО, для анализа каротиноидов – β -каротин, а для тритерпенов – лекарственный препарат «Глицирам».

Первая стадия – приготовление системы растворителей. Компоненты выбранной системы растворителей в соответствующих объемах помещали в камеру для хроматографирования. Систему в камере аккуратно перемешивали и выжидали 1,5-2,0 часа для насыщения камеры парами веществ, входящих в состав системы растворителей.

Вторая стадия – подготовка пластин. На пластинках «Sorbfil» карандашом отмечали линия старта и линия финиша. Для очистки пластины помещали в камеру для хроматографирования с приготовленной заранее системой. По достижении линии финиша пластины вынимали и сушили в сушильном шкафу.

Пластину «Sorbfil» ПТСХ-АФ-В-УФ использовали для качественного анализа флавоноидов, т.к. эта группа БАВ обладает способностью к люминисценции, а пластину «Sorbfil» ПТСХ-АФ-В использовали для обнаружения тритерпенов и каротиноидов.

Третья стадия – хроматографирование в системе растворителей. На линию старта наносили растворы свидетелей и растворы исследуемых образцов. Пластину ставили в камеру для хроматографирования с системой растворителей. По достижении линии фронта пробега пластину вынимали и высушивали в сушильном шкафу.

Четвертая стадия – детектирование исследуемых веществ. Для детектирования тритерпенов и каротиноидов использовали проявляющие вещества, такие как фосфорно-вольфрамовая кислота, фосфорно-молибденовая кислота и др. Для проявления флавоноидов применяли УФ-излучение, пары аммиака, раствор алюминия хлорида и др.

Пятая стадия – обработка результатов. По полученным данным рассчитывали R_f -факторы для стандартных и исследуемых образцов. На их

основе делали вывод о содержании тех или иных веществ (или групп веществ) в экспериментальных образцах препаратов.

2.2.5.2 Количественный анализ экспериментальных образцов препаратов на содержание белков, полисахаридов, фенольных соединений, флавоноидов и каротиноидов

Для анализа содержания белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в экспериментальных образцах препаратов из высших грибов использовали разработанные нами экспресс-методики количественного определения БАВ, позволяющие использовать малые объемы исследуемых проб и реактивов и проводить анализы для нескольких десятков образцов.

При разработке методики анализа содержания белка использовали метод Бредфорд, полисахаридов – метод Дрейвуда [76], фенольных соединений – фотоколориметрический метод Фолина-Чикольте [196], флавоноидов – метод дифференциальной спектрофотометрии по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия [57].

Метод Бредфорд основан на реакции красителя Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм [123]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Модифицированный антроновый метод Дрейвуда включает кислотный гидролиз полисахаридов серной кислотой с получением моносахаридов, образующих с антроном окрашенные комплексы сине-зеленого цвета с максимумом спектра поглощения при 520-625 нм. При разбавлении реакционной смеси этиловым спиртом максимум спектра поглощения смещается до 430 нм [76]. Определение содержания полисахаридов проводят в пересчете на глюкозу, используя предварительно построенный калибровочный график зависимости величины оптической плотности глюкозы ($\lambda=430$ нм) от концентрации.

Метод Фолина-Чикольте основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота

[196]. Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя.

Фотоколориметрические методы анализа, основанные на реакции комплексообразования флавоноидов с солями металлов, проявляют высокую специфичность по отношению к флавоноидам. При этом образуются окрашенные соединения, имеющие флуоресценцию, и наблюдается батохромный сдвиг [8; 57].

Разработка методик количественного анализа суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в экспериментальных образцах препаратов подробно описана в п. 3.3.2.

Метод количественного определения каротиноидов основан на спектрофотометрическом определении массовой концентрации каротина в растворе, полученном после экстрагирования каротина из испытуемых образцов органическим растворителем [95].

Процесс проведения анализа экспериментальных образцов препаратов на содержание каротиноидов включает этапы: экстракция этанолом 96% из сухого препарата, 4-6-ти кратную экстракцию гексаном из препарата, объединение этанольного и гексанового экстрактов, добавление воды к объединенному экстракту для разделения фракций, отбор верхнего гексанового слоя, измерение оптической плотности на спектрофотометре, обработка результатов.

Методика проведения анализа. 100 мг экспериментального образца препарата помещали в микропробирку на 1,5 мл. В микропробирку вносили 500 мкл 96% этанола. Сухой препарат растирали стеклянной или тефлоновой палочкой. Смесь центрифугировали при 4-5 тыс. об./мин в течение 3-4 минут. Спиртовый раствор сливали в градуированную пробирку с завинчивающейся крышкой на 5 мл. Осадок в пробирке обрабатывали 5 раз гексаном в объеме 500 мкл (общий объем – 2500 мкл). После центрифугирования раствор сливали в ту же градуированную пробирку. К объединенному (эфирно-этанольному) раствору добавляли 1000 мкл воды дистиллированной. Смесь встряхивали и центрифугировали при 4-5 тыс. об./мин в течение 3-4 минут. Гексановый слой отбирали автоматической пипеткой и переносили в чистую промаркированную

пробирку, нижний водно-этанольный слой отбрасывали. Фиксировали объем гексановой фракции раствора. Измеряли оптическую плотность гексановой фракции при длине волны 451 нм против гексана. На основании калибровочного графика по измеренной оптической плотности проб рассчитывали содержание β -каротина в мкг/г по следующей формуле (1):

$$X = C \cdot V / m, \quad (1)$$

где C – концентрация каротина по градуировочному графику, мкг/мл; m – навеска вещества, мг; V – объем анализируемого раствора, мл.

2.2.6 Методы тестирования биологической активности

2.2.6.1 Анализ антиоксидантной активности

Методы исследования общей антиокислительной активности различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. По способам регистрации проявляемой антиокислительной активности можно разделить методы на волюмометрические [219], фотометрические [149; 173; 208], хемилюминесцентные [67; 155], флуоресцентные [124; 133; 226], электрохимические [56;] и ряд более специфических [194; 197; 199]. Другая группа методов [199; 224] основана на непосредственном измерении окислительно-восстановительных потенциалов. Общую антиоксидантную активность, как правило, устанавливают по поглощению кислорода при перекисном липидном окислении [219], окислению кроцина [149; 173; 208], хемилюминесценции с люминолом [67], окислению R-фикоэритрина [139], чувствительности эритроцитов к гемолизу [118], восстанавливающей железо активности [122], генерировании липидных перекисей [131]. Известен целый ряд методов [144] среди которых можно выделить простые в исполнении методы восстановления железа, основанные на том, что ионы железа (III) способны окислять антиоксидант, восстанавливаясь до ионов железа (II). Контроль за течением процесса в этом случае можно вести двумя способами: по убыли ионов железа (III) или по увеличению концентрации ионов железа (II).

Для этого используют вспомогательные вещества, образующие окрашенные комплексы с одним из этих ионов.

Таким образом, для анализа общей антиоксидантной активности экспериментальных образцов препаратов были выбраны фотометрические методы: метод восстановления железа (FRAP) и метод, основанный на торможении окисления Твин-80 до малонового диальдегида, которые приведены далее.

Анализ восстанавливающей способности

Восстанавливающую способность экспериментальных образцов препаратов оценивали по методу восстановления железа. Способность экспериментальных образцов препаратов грибов восстанавливать железо-феррицианидный комплекс Берлинской лазури определяли по поглощению на длине волны 695 нм. Известно, что увеличение поглощения реакционной смеси при увеличении концентрации сухого вещества в растворе свидетельствует о повышении способности образцов восстанавливать трехвалентное железо ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) [121; 183].

Методика проведения анализа. Для анализа готовили разведения экспериментального образца препарата в 2, 4, 8, 16, 32 раза. Далее 160 мкл образца смешивали с 400 мкл 0,2 М фосфатного буфера (pH 6,6) и 400 мкл 1% раствора феррицианида калия. Полученную смесь выдерживали при 50-55 °С в течение 20 мин, затем к смеси добавляли 400 мкл 10% трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 5-6 тыс. об./мин 5-10 минут. К супернатанту добавляли 275 мкл 0,1% раствора хлорида железа (III). Спектры поглощения записывали на длине волны 695 нм.

Анализ антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха

Антиоксидантная активность экспериментальных образцов препаратов оценивалась в реакции окисления полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (Твин-80) кислородом воздуха. Данная система моделирует перекисное окисление липидов плазмы крови [105].

Методика проведения анализа. В микропробирки на 2,0 мл вносили реакционную смесь следующего состава: 1000 мкл 1% водного раствора Твина-80, 50 мкл 0,001 моль/л раствора сульфата железа (II), 100 мкл 0,01 моль/л раствор аскорбиновой кислоты, 100 мкл раствора экспериментального образца препарата. В контрольный раствор вместо пробы вносили 100 мкл воды. Смесь перемешивали и ставили в термостат при 40 °С на 48 ч. По прошествии этого времени к реакционной смеси приливали 650 мкл 40% раствора трихлоруксусной кислоты, смесь перемешивали и выдерживали в течение 1 ч. Затем смесь центрифугировали при 5-6 тыс. об./мин в течение 10 минут. Супернатант отделяли от осадка и переносили в полипропиленовые пробирки на 4 мл с завинчивающейся крышкой из полипропилена. К супернатанту прибавляли 1300 мкл 0,25% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Смесь встряхивали и выдерживали 15 минут в термостате жидкостном ЛТ-4 при 100 °С, затем охлаждали. Измеряли оптическую плотность окрашенного в розовый цвет триметинового комплекса продуктов окисления с 2-тиобарбитуровой кислотой при длине волны 532 нм в контрольных и опытных образцах. Антиоксидантную активность в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха рассчитывали в % по формуле (2):

$$AOA = \frac{(D_k - D_{оп}) \times 100\%}{D_k}, \quad (2)$$

где АОА – антиоксидантная активность; D_k , $D_{оп}$ – оптическая плотность при длине волны 532 нм в контрольном и опытном образцах соответственно.

В качестве положительных контролей (образцов сравнения) для анализа антиоксидантной активности использовали препараты, обладающие антиоксидантной активностью: чай черный Greenfield Kenyan Sunrise, аскорбиновую кислоту, кислоту галловую ГСО, арбутин ГСО и дигидрокверцетин ГСО.

Фитопрепарат на основе чая черного Greenfield Kenyan Sunrise (Кения) «Орими Трейд» готовили следующим образом: к 2 г сырья приливали 200 мл

горячей воды. Настаивали при комнатной температуре 2-3 мин. Фильтровали через стеклянный фильтр.

2.2.6.2 Анализ токсичности экспериментальных образцов препаратов *in vitro*

Для определения токсических концентраций для культуры клеток Vero или MDCK экспериментальные образцы грибных препаратов последовательно разводили поддерживающей средой DMEM или RPMI-1640 соответственно и оценивали наличие токсического действия в монослоях этих культур с помощью инвертированного микроскопа. Для этого сначала делали разведения растворов экспериментальных образцов грибных препаратов (5 мг/мл) в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 раз соответствующими средами, вносили по 100 мкл в лунки планшетов с монослоями клеток (по 4 лунки на каждое разведение) и ставили в термостат при температуре 37 °C, 5 % CO₂ и 100 % влажности на 2 суток для культуры клеток MDCK и 4 суток для культуры клеток Vero. После инкубации с помощью инвертированного микроскопа Биолам П2-1 (Россия) оценивали деструктивные изменения в монослоях клеток MDCK и Vero, инкубированных с разными концентрациями грибного препарата. В качестве контролей использовали монослои культур клеток MDCK и Vero без экспериментальных образцов препаратов. Для культур клеток MDCK и Vero определяли максимально переносимые концентрации экспериментальных образцов препаратов, равные их концентрациям, не оказывающим на данные клетки токсического действия ни в одной из лунок [86].

2.2.6.3 Анализ противоопухолевой активности *in vitro*

Изучение противоопухолевой активности *in vitro* позволяет оценить прямой цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Исследование *in vitro* может проводиться на всех стадиях разработки противоопухолевых препаратов.

Для изучения цитотоксической активности *in vitro* используются следующие методы оценки: метод подсчета клеток, МТТ-тест, ³Н-тимидиновый тест.

Метод подсчета клеток включает пассивирование клеток с последующим внесением тестируемого препарата и определением количества клеток в мл среды по окончании периода инкубации с помощью микроскопа.

МТТ-тест основан на способности фермента сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны клеток млекопитающих восстанавливать желтую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Интенсивность накопления кристаллов формазана в цитоплазме позволяет оценить уровень митохондриального дыхания клетки, что является показателем ее жизнеспособности.

³Н-тимидиновый тест проводят как с использованием дисков для определения ³Н-тимидина, включившегося в ДНК клетки, так и с помощью измерения радиоактивности кислотных гидролизатов кислотонерастворимой фракции клеток [85].

В настоящей работе исследование цитотоксической активности экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* проводили методом подсчета клеток. Для оценки цитотоксической активности использовали культуру клеток Нер-2 (карцинома гортани человека). Культивирование клеток Нер-2 проводили в питательной среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови («HyClone», США), при температуре 37 °С в течение 24 часов. Для снятия клеток со стекла применяли 0,25%-ый раствор трипсина и 0,02%-ый раствор Версена в соотношении 1:1.

Для определения цитотоксической активности экспериментальных образцов препаратов клетки пассивировали (с концентрацией 1×10^5 кл./мл) в культуральные флаконы, содержащие по 5 мл готовой питательной среды Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови, и инкубировали в течение 24 часов перед добавлением растворов препаратов. После окончания инкубации во флаконы с клетками добавляли по 500 мкл раствора исследуемого препарата из *Daedaleopsis tricolor* в различных концентрациях. Конечные концентрации

препаратов в суспензии составили 50, 100, 200, 300, 400 мкг/мл. Инкубацию с препаратом проводили в течение 48 часов при 37 °С.

В качестве отрицательного контроля использовали суспензию культуры клеток Нер-2 без добавления исследуемого препарата. В качестве референс-препарата (положительного контроля) использовали противоопухолевый препарат Цисплатин-ЛЭНС.

Все эксперименты по культивированию клеток проводили в 4-х повторностях.

По окончании инкубации, оценивали морфологию клеток и подсчитывали количество клеток с помощью камеры Горяева под микроскопом по стандартной методике [63].

Рассчитывали концентрацию клеток в 1 мл среды для исследуемых препаратов из *Daedaleopsis tricolor* ($N_{\text{опыт}}$) при разной концентрации (50, 100, 200, 300, 400 мкг/мл), для референс-препарата при разной концентрации (0,5, 1,0, 1,5 мкг/мл) и для отрицательного контроля ($N_{\text{контр}}$), выращиваемых вместе с каждой партией экспериментальной культуры.

Далее рассчитывали степень подавления роста клеток Нер-2 [85] под влиянием исследуемых препаратов и референс-препарата по формуле (3):

$$N\% = \left(1 - \frac{N_{\text{опыт}}}{N_{\text{контр}}}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

где $N\%$ – степень подавления роста клеток, %; $N_{\text{контр}}$ – концентрация клеток в контроле, кл./мл; $N_{\text{опыт}}$ – концентрация клеток в опыте, кл./мл.

Общепринятой единицей выражения цитостатического действия является IC_{50} – это концентрация препарата, ингибирующая рост культуры клеток на 50%, т.е. такая концентрация препарата, при которой степень подавления роста клеток ($N\%$) равна 50%. На основании этой величины можно сравнивать противоопухолевую активность препаратов [85; 116].

2.2.6.4. Анализ противовирусной активности *in vitro*

Для тестирования противовирусной эффективности экспериментальных образцов препаратов в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005

(H5N1), вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) и вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS), полученных из Коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», использовали перевиваемые культуры клеток Vero и MDCK, полученные из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». При этом для анализа противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов в отношении вирусов гриппа использовали культуру клеток MDCK, а в отношении вируса простого герпеса 2-го типа и вируса осповакцины использовали клеточную линию Vero.

Изучение противовирусной активности препаратов по индексу нейтрализации вирусов гриппа в культуре клеток MDCK

В опытах по определению противовирусной активности грибных препаратов в отношении вируса гриппа субтипов A/H3N2 и A/H5N1 готовили десятикратные разведения (с 1-го по 8-е) соответствующих образцов ВКЖ с использованием поддерживающей среды RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина ТРСК (Sigma, США), без эмбриональной сыворотки. В этих экспериментах концентрация экспериментальных образцов препаратов в среде культивирования клеток с вирусом гриппа соответствовала их максимально переносимым концентрациям для клеточной культуры MDCK.

Для определения противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов на монослой клеток MDCK сначала вносили по 50 мкл приготовленных разведений препаратов с использованием поддерживающей среды RPMI-1640, содержащей 4 мкг/мл трипсина, а потом – по 50 мкл десятикратных разведений (с 1-го по 8-е) ВКЖ (по 6 лунок на каждое разведение). В контрольные лунки с клетками MDCK и соответствующими разведениями штаммов вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) или A/Aichi/2/68 (H3N2) вместо исследуемых препаратов вносили по 50 мкл поддерживающей среды. Клетки с вирусом инкубировали в течение 2 суток при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Через 2 суток в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие вируса в монослое клеток и определяли его наличие в среде

культивирования по реакции гемагглютинации с 1% суспензией эритроцитов кур. Титры ВГ в опыте (с препаратом) и контроле (без препарата) рассчитывали в lg ТЦД₅₀/мл, выражали в виде $M \pm S_m$ и сравнивали по методу Спирмена-Кербера [37]. Вирусингибирующее действие экспериментальных образцов препаратов базидиомицетов оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем, для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН, в lg) вируса под влиянием препаратов по формуле 4:

$$\text{ИН} = \text{Титр вируса}_{\text{контроль}} - \text{Титр вируса}_{\text{опыт}} (\lg) \quad (4)$$

Индекс нейтрализации вирусов является одним из критериев оценки противовирусного эффекта разрабатываемых препаратов. Выраженную противовирусную активность проявляют те препараты, у которых снижение титра вирусов при действии препарата, в максимально переносимой концентрации, составляет не менее 2,0 lg [86].

Изучение противовирусной активности препаратов по индексу нейтрализации вируса простого герпеса 2-го типа в культуре клеток Vero

В опытах по определению противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов в отношении вируса простого герпеса 2-го типа готовили десятикратные разведения (с 1-го по 8-е) образцов ВКЖ с использованием поддерживающей среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с 2% эмбриональной сыворотки («HyClone», США).

Сначала в лунки с монослоем клеток Vero вносили по 100 мкл приготовленных разведений экспериментальных образцов препаратов с тем расчетом, что в среде культивирования клеток с вирусом их концентрация соответствовала максимально переносимой концентрации для клеточной культуры Vero. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл разведений вируса простого герпеса 2-го типа (по 6 лунок на каждое разведение). В контрольные лунки с инфицированными клетками аналогично вносили по 100 мкл поддерживающей питательной среды DMEM. Клетки с вирусом инкубировали 4 суток при температуре 37 °C в атмосфере с 5% CO₂. Через 4 суток в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали наличие вируса

по цитопатическому действию на монослой клеток. На основании этого рассчитывали титры вируса простого герпеса 2-го типа в опыте (с исследуемым препаратом) и контроле (без исследуемого препарата) в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, выражали в виде $M \pm S_m$ и сравнивали по методу Спирмена-Кербера [37]. Противовирусное действие экспериментальных образцов препаратов оценивали по уменьшению титра вируса в опыте по сравнению с титром вируса в контроле. Для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН, в \lg) вируса под влиянием грибных препаратов по формуле 4.

Изучение противовирусной активности препаратов по индексу нейтрализации вируса осповакцины в культуре клеток Vero

В экспериментах использовали метод подсчета количества бляшек при внесении последовательных десятикратных разведений образцов вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) на монослой культуры клеток Vero, выращенные в лунках 24-луночных планшетов (Costar, США) [175].

В лунки 24-луночных планшетов с монослоем клеточной культуры Vero после удаления ростовой среды сначала вносили по 100 мкл экспериментальных образцов препаратов в концентрации, превышающую максимально переносимую в 2 раза, а потом – по 100 мкл приготовленных разведений ВКЖ, на каждое разведение использовали по 4 лунки. Через 1 час после адсорбции вируса вносили по 800 мкл поддерживающей питательной среды DMEM, содержащей 2% эмбриональной сыворотки («HyClone», США). При этом концентрация сухого вещества в среде культивирования клеток с вирусом была в 5 раз меньше, чем максимально переносимая концентрация для клеточной культуры Vero. В качестве контроля использовали лунки с клеточным монослоем, в которые вносили 100 мкл поддерживающей питательной среды и 100 мкл разведений ВКЖ. Клетки инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 4 суток. По окончании срока культивирования монослой окрашивали 0,1% раствором генцианового фиолетового (Sigma, США) и подсчитывали количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) в лунках. Для подсчета использовали те лунки, в которых количество БОЕ при внесении соответствующего разведения вируса

находилось в пределах 10 – 100. Титры ВОВ рассчитывали \lg БОЕ/мл, выражали в виде $M \pm S_m$ для 4-х повторов десятикратных разведений ВКЖ в контроле (без препарата) и в опыте (с препаратом) и сравнивали по t-критерию Стьюдента [37; 175]. Оценку противовирусного действия исследуемых экспериментальных образцов препаратов производили по индексу нейтрализации вируса под влиянием грибных препаратов по формуле 4.

2.2.7 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью вычислений средних значений и ошибки среднего ($M \pm m$) или среднестатистических отклонений ($M \pm S_m$) с использованием пакета программ для статистической обработки Microsoft Excel. Коэффициент корреляции рассчитывался по методу Пирсона. Различия между двумя группами экспериментальных данных сравнивали по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$ [37].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка технологии выделения биологически активных веществ из высших базидиомицетов

Важнейшим этапом создания препаратов на основе высших грибов является разработка оптимальной технологии выделения различных групп биологически активных соединений.

На сегодняшний день существует обширный спектр публикаций, в которых описаны результаты исследований по разработке и оптимизации технологии извлечения БАВ из растительного сырья [13; 24; 41; 70; 81; 88; 117]. В результате этих исследований установлены параметры процесса экстрагирования из травы девясила иволистного *Inulasa licina* [13], коры лиственницы Гмелина *Larix gmelinii* [24], коры лиственницы сибирской *Larix sibirica* и лиственницы даурской *Larix gmelinii* [41], можжевельника Сибирского *Juniperus sibirica* [70], листьев какалии копьевидной *Cacalia hastata* [77], надземной части зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* [81], коры сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* [88], крапивы двудомной *Urtica dioica* [117].

Однако при этом существуют лишь единицы публикаций, посвященных оптимизации технологических параметров извлечения БАВ из грибного сырья [48; 78].

С учетом значительных морфологических и анатомических отличий между растениями и грибами, технология выделения БАВ из грибного сырья имеет свои особенности и отличия. К основным отличиям царства грибы от царства растения относятся: гетеротрофный тип питания, поликариотичность, способность образовывать гифы и мицелий, неспособность к образованию истинных тканей. Кроме того, клеточная стенка грибов содержит хитин, что часто усложняет диффузию БАВ из сырья в экстрагент. Следовательно, структура грибного сырья и структура растительного сырья имеют значительные отличия. Таким образом, технология выделения БАВ из грибного сырья принципиально отличается от технологии выделения БАВ из растительного сырья.

В связи с тем, что базидиомицеты содержат комплекс БАВ, различающихся как по физико-химическим свойствам, так и по биологической активности, следует разработать рациональную технологию полноценного извлечения широкого спектра биологически активных соединений из грибного сырья.

Одним из актуальных и приоритетных направлений разработки новых лекарственных препаратов является получение сухих экстрактов из природных источников, учитывая удобство дозирования и увеличения сроков хранения лекарств [36]. Метод экстракции, будучи самым распространенным из используемых способов выделения широкого спектра БАВ, позволяет максимально сохранить структуру, а вместе с ней и биологическую активность экстрагируемых БАВ.

Планируемый результат экстракции зависит от технологических параметров процесса диффузии выделяемых веществ из твердого сырья в жидкую фазу. Основными факторами, влияющими на скорость и полноту экстракции БАВ из грибов, являются: метод экстракции, тип и концентрация экстрагента, степень измельчения сырья, соотношение сырья к экстрагенту, температура, продолжительность экстракции. Основным критерием оценки при оптимизации параметров экстракции был выбран процент выхода экстрактивных веществ [82; 83]. Также учитывали содержание в сухом экстракте таких групп БАВ как полисахариды, флавоноиды и белки. Параметры процесса экстрагирования выделяемых БАВ оптимизировали путем многофакторного планирования серии экспериментов.

В качестве модельной системы при разработке универсальной технологии выделения БАВ использовали плодовые тела трутовика настоящего *Fomes fomentarius*. Это связано с тем, что трутовик настоящий *F. fomentarius* является одним из наиболее распространенных дереворазрушающих грибов среди лесных базидиомицетов (от 50 до 76%) [3]. Многолетние плодовые тела гриба являются доступным возобновляемым сырьем. Кроме того, измельченные плодовые тела данного базидиомицета представляют собой достаточно твердый материал, что

делает выделение БАВ из *F. fomentarius* трудоемким с технологической точки зрения.

Плодовые тела гриба *F. fomentarius* собраны на территории Караканского бора Новосибирской области в 2011-2012 гг.

Выбор метода экстракции

Для выделения спирторастворимых БАВ из плодовых тел гриба *F. fomentarius* использовали как статические, так и динамические методы экстракции: мацерацию, дробную мацерацию и экстракцию с применением сверхвысоких частот.

- 1) **Мацерация** заключается в однократном экстрагировании БАВ из одной порции сырья. Данный метод прост, но обладает низкой эффективностью и не позволяет полностью истощить сырье.
- 2) **Ремацерация.** Скорость диффузии вещества лимитируется градиентом концентрации между концентрацией экстрагируемого вещества у поверхности твердого тела и его средней концентрацией в основной массе раствора. В связи с тем, что вблизи поверхности сырья равновесие нередко устанавливается сравнительно быстро, концентрация на границе фаз часто принимается за концентрацию насыщения. Исходя из этого, проведение процесса выделения БАВ с делением экстрагента на части и последовательным экстрагированием (каждое извлечение сливается) позволяет при меньших затратах времени полнее истощить сырье благодаря поддержанию высокого градиента концентрации в сырье и экстрагенте. В качестве метода экстракции был выбран метод дробной мацерации, который проводили в четыре стадии настаивания.
- 3) Экстракция на основе **микроволновых** технологий. В настоящее время большое внимание уделяется использованию микроволновых технологий в различных отраслях промышленности. В работе показано [52], что процесс экстрагирования интенсифицируется за счет воздействия сверхвысоких частот (СВЧ). Эффективность СВЧ-обработки применительно к экстрагированию определяется безынерционным нагревом объекта, обусловленным наличием в

нем жидкости. Это приводит к вскипанию экстрагента внутри частиц сырья, разрушению клеточных стенок и массопереносу БАВ от центра частиц к периферии [79]. В эксперименте СВЧ-излучению подвергали не всю суспензию, а отжатое сырье между этапами экстракции.

В таблице 2 указаны выходы экстрактивных веществ в зависимости от метода экстрагирования.

Таблица 2 – Выход экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* в зависимости от метода экстракции

Метод экстракции	Выход экстрактивных веществ из сырья Y_E , % ($M \pm m$)($n=3$)
Мацерация	$4,2 \pm 0,2$
Дробная мацерация	$5,6 \pm 0,4^@$
Дробная мацерация в сочетании с СВЧ-обработкой (600 Вт, 30 сек.)	$5,9 \pm 0,4^@$

Примечания: М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; [@] – отличие от показателя для метода мацерации при $p \leq 0,05$.

На основании результатов экспериментов, приведенных в таблице 2, показано, что наименьший выход экстрактивных веществ из *F. fomentarius* наблюдался при использовании метода мацерации, а наибольший – метода дробной мацерации в сочетании с СВЧ-обработкой. Отмечено, что выход экстрактивных веществ по методу дробной мацерации достоверно превышает таковой по методу мацерации.

Показано, что дробная мацерация в сочетании с СВЧ-обработкой не приводит к достоверному увеличению выхода экстрактивных веществ относительно экстракции дробной мацерацией. Исходя из этого, использование СВЧ-обработки экономически невыгодно в связи с энергозатратами на нее.

Таким образом, оптимальным методом выделения БАВ является дробная мацерация. Данный метод экстракции использовали для разработки технологии выделения БАВ из базидиальных грибов.

Выбор экстрагентов

Существует широкий спектр экстрагентов как полярных (вода, глицерин, водно-спиртовые растворы), извлекающих в основном гидрофильные вещества, так и неполярных (метанол, пропанол, этанол, ацетон) и неполярных (хлороформ, дихлорэтан, этилацетат, бензол, масла растительные) экстрагентов [82; 83]. Неполярные экстрагенты извлекают в основном гидрофобные вещества. В связи с тем, что хлороформ, пропанол, бензол, дихлорэтан и, особенно, метанол ядовиты, применение данных экстрагентов в промышленности ограничено.

При выборе оптимального экстрагента учитывался тот факт, что из всех групп БАВ, содержащихся в высших базидиомицетах, чаще всего биологическую активность проявляют полисахариды [129; 217], фенольные соединения [120; 158; 171; 230], белки [211; 223], тритерпены [135; 166; 180]. Исходя из вышесказанного, в качестве экстрагентов выбраны вода дистиллированная и водно-этанольная смесь, так как данные экстрагенты применяются для выделения перечисленных групп БАВ [29; 73; 185].

Этиловый спирт, как экстрагент, имеет более широкий диапазон извлечения БАВ, чем вода дистиллированная. Однако вода, как правило, лучше извлекает из сырья такие соединения как полисахариды, белки и другие водорастворимые вещества. Поэтому технология извлечения БАВ должна включать получение как спиртового, так и водного экстракта. Следует отметить, что экстракты, получаемые экстракцией водой или водно-этанольной смесью, будут иметь хорошую (умеренную) растворимость в воде, что положительно повлияет на биодоступность разрабатываемого препарата на основе высших базидиомицетов.

Исходя из вышесказанного, в настоящей работе в качестве экстрагентов использовали воду дистиллированную и водно-этанольную смесь.

3.1.1 Оптимизация технологии получения этанольного экстракта

Выбор концентрации этанола в экстрагенте

При экстракции использовали различные концентрации этилового спирта в водно-этанольной смеси: 20%, 40 %, 60 %, 70 % и 80 %. В таблице 3 показаны

результаты исследования зависимости $Y_E = f(C_{Et})$ выхода экстрактивных веществ и $C_{\Phi L} = f(C_{Et})$ содержания флавоноидов от концентрации этанола в экстрагенте.

Таблица 3 – Выход экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* и содержание флавоноидов в пересчете на сухой экстракт в зависимости от концентрации этанола в экстрагенте

Концентрация этанола в экстрагенте C_{Et} , %	Выход экстрактивных веществ из сырья Y_E , % ($M \pm m$)($n=3$)	Содержание флавоноидов в сухом экстракте, $C_{\Phi L}$, мг/г ($M \pm m$)($n=4$)
20	$4,0 \pm 0,1^{*@}$	$58 \pm 5^{*@}$
40	$4,4 \pm 0,2^{*@}$	$79 \pm 5^{*@}$
60	$5,4 \pm 0,1$	$115 \pm 6^{@}$
70	$5,6 \pm 0,4$	303 ± 11
80	$5,6 \pm 0,1$	248 ± 6

Примечания: М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для $C_{Et} = 60\%$ при $p \leq 0,05$; @ – отличие от соответствующего показателя для $C_{Et} = 70\%$ при $p \leq 0,05$.

Показано, что выход экстрактивных веществ из *F. fomentarius* при четырехкратном экстрагировании во всех извлечениях был сравнительно невысок для сырья природного происхождения и составлял от $4,0 \pm 0,2$ до $5,6 \pm 0,4$ % (таблица 3).

Выявлена функциональная зависимость выхода экстрактивных веществ из плодовых тел гриба *F. fomentarius* от концентрации этилового спирта в экстрагенте $Y_E = f(C_{Et})$. Отмечено, что выход экстрактивных веществ, полученных при использовании в качестве экстрагента 60%, 70 % и 80% этилового спирта был достоверно выше, чем выход экстрактивных веществ с использованием 20% и 40 % этилового спирта.

Обнаружена функциональная зависимость содержания флавоноидов в сухих экстрактах из плодовых тел *F. fomentarius* от концентрации этилового спирта в экстрагенте $C_{\Phi L} = f(C_{Et})$, которая проявляется в увеличении содержания флавоноидов в экстракте с увеличением концентрации этилового спирта.

Максимальное содержание флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин (303 ± 13 мг/г) выявлено в экстрактах, полученных с использованием 70 % этилового спирта.

Таким образом, 70% этиловый спирт является оптимальным экстрагентом для извлечения спирторастворимых веществ.

Степень измельчения сырья

Согласно закону диффузии, количество извлеченного вещества тем выше, чем больше площадь поверхности раздела фаз. Измельчение сырья приводит к увеличению поверхности соприкосновения фаз и, таким образом, позволяет сократить путь диффундирующего вещества из глубины к поверхности материала. Следует отметить, что клеточные стенки грибов являются значительным препятствием для прохождения экстрагента [82; 83].

В работе Ооржак У.С. и соавт. приводятся результаты по влиянию степени измельчения сырья на выход экстрактивных веществ из ксилотрофного гриба листовенничная губка *Fomitopsis officinalis*. Выявлено, что наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается из сырья размером от 1 до 3 мм [78]. Однако измельченные плодовые тела *Fomes fomentarius* являются твердым сырьем, даже в сравнении с плодовыми телами других ксилотрофных грибов, и требуют более тонкого измельчения.

В связи со способностью базидиальных грибов образовывать гифы, частицы измельченного гриба редко бывают изодиаметричными. Кроме того, полисахарид клеточной стенки грибов – хитин – усложняет измельчение гиф. Из этого следует, что частицы измельченного грибного сырья неоднородны, и большинство из них представляют собой нитевидную структуру. Таким образом, степень измельчения сырья даже после прохождения через сито будет варьировать в широком диапазоне. На рисунках 3 и 4 представлены микрофотографии плодовых тел *F. fomentarius*, измельченных на мельнице IKA® WERKE MF-10 и прошедших через сито с размером отверстий 1 мм.

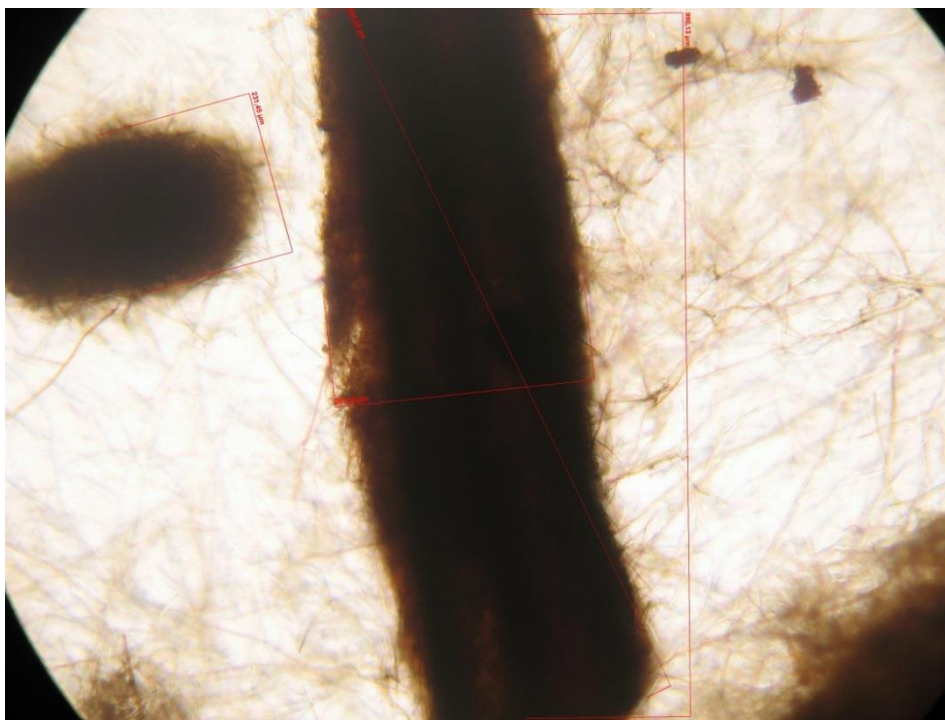


Рисунок 3 – Плодовое тело *Fomes fomentarius* измельченное (увеличение $\times 100$)
(фото Косоговой Т.А.)

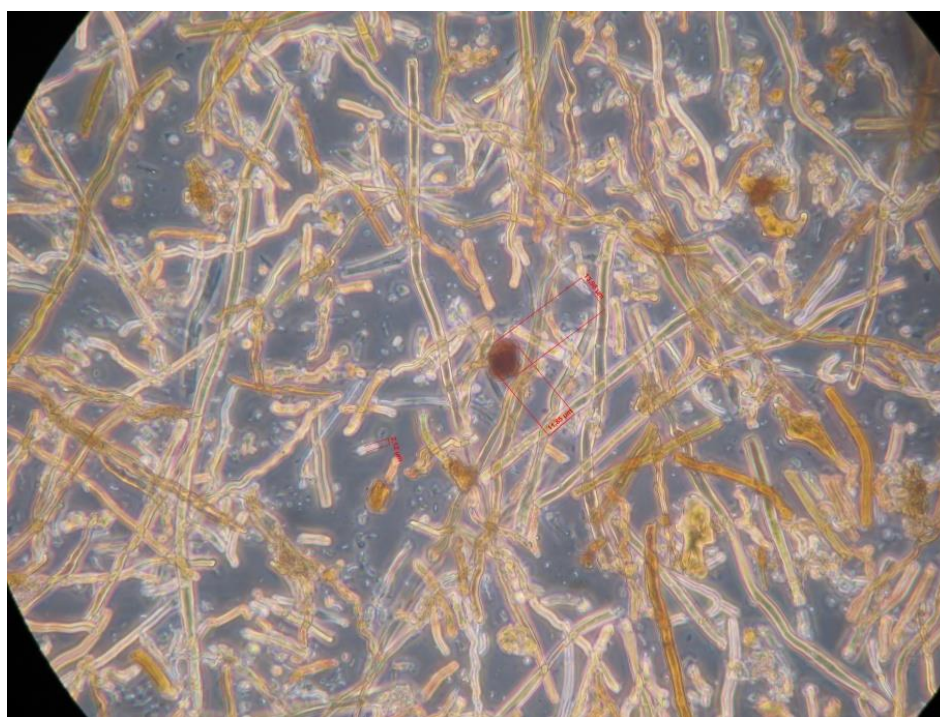


Рисунок 4 – Плодовое тело *Fomes fomentarius* измельченное (увеличение $\times 400$)
(фото Косоговой Т.А.)

Отмечено присутствие крупных частиц, длина которых составляет более 1000 мкм, а также мелких частиц и гиф, ширина которых составляет 2-6 мкм, а длина от 10 до 1000 мкм. Большинство частиц имеют гифальную структуру и

поэтому не являются изодиаметричными. Исходя из этого размер грибных частиц, прошедших через сито с размером отверстий 1 мм варьируется в широких интервалах.

Выбор соотношения сырья к экстрагенту

Для определения оптимального соотношения сырья к экстрагенту использовали разные соотношения (1:30, 1:40, 1:50, 1:60) и четырехкратное экстрагирование БАВ 70% этанолом в течение 8 часов при 60 °С.

Для обеспечения смачиваемости измельченных плодовых тел *F. fomentarius*, имеющих большой насыпной объем по сравнению с растительным сырьем, были выбраны максимально возможные объемы экстрагента по отношению к сырью. Однако при этом увеличивается общий объем вытяжки и, соответственно, время высушивания, что может привести к распаду БАВ. Поэтому перед сушкой экстракт упаривали на ротационном испарителе Rotavapor RE 120 под вакуумом, т.к. пониженное давление уменьшает температуру кипения и, таким образом ускоряет процесс удаления экстрагента, без повышения температуры.

Результаты исследования влияния различных соотношений сырья к экстрагенту на выход экстрактивных веществ приводятся в таблице 4.

Таблица 4 – Выход экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* при различных соотношениях сырья к экстрагенту

Соотношение сырья (г) к экстрагенту (мл) R	Соотношение сырья (г) к экстрагенту (мл) по фазам экстракции				Выход экстрактивных веществ из сырья Y_E , % ($M \pm m$)($n=3$)
	1 фаза	2 фаза	3 фаза	4 фаза	
1:30	1:10	1:10	1:5	1:5	$6,5 \pm 0,1^*$
1:40	1:12	1:10	1:10	1:7	$6,8 \pm 0,1^{*@}$
1:50	1:15	1:15	1:10	1:10	$7,2 \pm 0,2^@$
1:60	1:20	1:15	1:15	1:10	$7,0 \pm 0,1^@$

Примечания: Y_E – выход экстрактивных веществ; R – соотношение сырья к экстрагенту; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для R 1:50 при $p \leq 0,05$; @ – отличие от соответствующего показателя для R 1:30 при $p \leq 0,05$.

Отмечена зависимость выхода экстрактивных веществ из плодовых тел *F. fomentarius* от соотношения сырья к экстрагенту $Y_E = f(R)$. Выявлено, что выход

экстрактивных веществ при соотношении сырья к экстрагенту 1:50 был достоверно выше, чем при соотношениях сырья к экстрагенту 1:30 и 1:40. При этом выходы экстрактивных веществ при соотношении сырья к экстрагенту 1:50 и 1:60 достоверно не отличались.

Таким образом, наиболее оптимальным соотношением сырья к экстрагенту является 1:50, т.к. дальнейшее повышение объема экстрагента по отношению к сырью существенно не увеличивало выход экстрактивных веществ.

Оптимизация температуры и времени экстракции

Оптимизацию таких параметров процесса экстракции как *температура* и *время* проводили при соотношении сырья к экстрагенту 1:50 и кратности экстрагирования 4. Результаты исследований влияния температуры и времени экстракции по *Fomes fomentarius*, собранных в 2011 и 2012 гг. представлены соответственно в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Влияние температуры и времени экстракции на выход экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* и содержание белка, полисахаридов, флавоноидов в пересчете на сухой экстракт

Время экстракции общее при температуре 60 °C					Температура экстракции в течение 24 часов (общее время)				
Параметр	Характеристики				Параметр	Характеристики			
τ , час	Y_E , % ($M \pm m$) (n=3)	C_B , мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ПС}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ФЛ}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)	T , °C	Y_E , % ($M \pm m$) (n=3)	C_B , мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ПС}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ФЛ}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)
8	5,6±0,4	23±2* [@]	152±15	303±11*	25	4,2±0,1 [§]	8±1	114±7	182±9
24	5,7±0,1*	9±1*	123±4	277±22*	40	4,8±0,1 ^{&§}	11±2	118±14	250±11 ^{&}
64	6,5±0,1	46±5	182±12	115±9	60	5,7±0,1 ^{&}	9±1	123±4	277±22 ^{&}
96	6,4±0,1	42±3	126±6	86±7					

Примечания: T – температура; τ – общее время; Y_E – выход экстрактивных веществ; C_B – содержание белков; $C_{ПС}$ – содержание полисахаридов; $C_{ФЛ}$ – содержание флавоноидов (в пересчете на дигидрокверцетин); M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя при $\tau = 64$ ч и $\tau = 96$ ч, при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от соответствующего показателя для $\tau = 24$ ч при $p \leq 0,05$; [&] – отличие от соответствующего показателя для $T = 25$ °C при $p \leq 0,05$; [§] – отличие от соответствующего показателя при $T = 60$ °C при $p \leq 0,05$.

Таблица 6 – Выход экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* в зависимости от температуры и времени экстракции

Параметры экстракции		Температура экстрагирования T , °C		
		25	40	60
		Y_E , % ($M \pm m$)($n=3$)		
Время экстракции общее τ , ч	4	4,2±0,1* [@]	6,1±0,1	7,2±0,1 [@]
	8	4,6±0,1*	6,5±0,1	7,2±0,2
	16	5,6±0,1	6,6±0,2	7,6±0,1
	24	5,8±0,3	6,4±0,2	7,7±0,1

Примечания: T – температура; τ – общее время; Y_E – выход экстрактивных веществ; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для $\tau = 16$ ч и $\tau = 24$ ч, при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от соответствующего показателя для $\tau = 24$ ч при $p \leq 0,05$.

Важным условием при получении экстрактов является температура экстрагирования, т.к. при ее повышении увеличивается коэффициент диффузии, а значит, процесс извлечения и растворения веществ ускоряется. Кроме того, при увеличении температуры повышается концентрация насыщения раствора, что также ускоряет процесс экстракции и увеличивает содержание БАВ в извлечении.

В таблицах 5 и 6 представлены экспериментальные данные по выходу экстрактивных веществ при температурах 25 °C, 40 °C, 60 °C в процессе экстракции дробной мацерацией 4-кратно по 6 часов. При этом выявлена функциональная зависимость выхода экстрактивных веществ от температуры $Y_E = f(T)$. Выход экстрактивных веществ при увеличении температуры с 25 °C до 40 °C достоверно увеличивается на 10-45% относительно исходного, с 25 °C до 60 °C достоверно увеличивается на 33-70% относительно исходного. При этом показана функциональная зависимость содержания флавоноидов от температуры процесса экстракции $C_{\Phi Л} = f(T)$, когда вместе с увеличением температуры в них достоверно увеличивается содержание флавоноидов от 182±9 мг/г при 25 °C до 277±22 мг/г при 60 °C. Исходя из результатов проведенных исследований, сделан вывод, что оптимальная температура экстракции составляет 60 °C.

Количество вещества, извлекаемого из сырья, прямо пропорционально времени экстракции. Все же чрезмерная продолжительность процесса экстракции приводит к загрязнению извлечений сопутствующими веществами с низкой

скоростью диффузии, а также к увеличению временных и энергетических затрат. Исходя из этого, необходимо определить минимальное время экстрагирования БАВ из грибного сырья при максимальной полноте извлечения БАВ, т.е. оптимальное время процесса.

Определение оптимального времени экстрагирования БАВ проводили при температуре 60 °С. На основании результатов, представленных в таблицах 5 и 6, выявлена функциональная зависимость выхода экстрагируемых веществ из *Fomes fomentarius* от времени экстракции $Y_E = f(\tau)$. Как видно из таблицы 5, значение выхода экстрактивных веществ при общем времени экстракции 24 часа достоверно (на 13-14%) отличается от выхода экстрактивных веществ при общем времени экстракции 64 и 96 часов. При этом значения выходов экстрактивных веществ, где время процесса экстракции составляло 8, 64 и 96 часов, достоверно не отличались друг от друга.

Как видно из таблицы 6, выход экстрактивных веществ при времени экстракции 4 часа и температуре 60 °С достоверно отличается от выхода экстрактивных веществ при времени экстракции 24 часа при той же температуре. Таким образом, при кратном увеличении общего времени экстракции не наблюдается достоверного прироста значения выхода экстрактивных веществ из гриба.

На основании результатов, представленных в таблице 5, показана обратная зависимость содержания флавоноидов от температуры процесса экстракции, $C_{\Phi Л} = f(\tau)$, когда с увеличением времени экстракции содержание флавоноидов в экстракте уменьшается. Отмечено, что содержание флавоноидов в сухих экстрактах *Fomes fomentarius*, полученных при экстрагировании в течение 8 и 24 часов, достоверно выше в 2-4 раза, чем в сухих экстрактах, полученных при экстрагировании в течение 64 и 96 часов.

Исходя из результатов проведенных исследований, сделан вывод, что оптимальное время экстракции – 4 часа.

На основании экспериментальных данных по экстрагированию БАВ этиловым спиртом, представленных в таблицах 5 и 6, был проведен многофакторный анализ и рассчитан коэффициент корреляции (таблица 7).

Таблица 7 – Многофакторный анализ технологических параметров процесса извлечения БАВ из плодовых тел базидиального гриба *Fomes fomentarius* водно-этанольной смесью

Обозначение параметра	Параметр	Коэффициент корреляции
τ	Общее время экстракции	$0,67 \pm 0,15$
T	Температура экстракции	$0,98 \pm 0,01$
R	Соотношение сырья к экстрагенту	$0,79 \pm 0,05$
C_{Et}	Концентрация экстрагента	$0,97 \pm 0,01$

В результате серии экспериментов, показана функциональная зависимость выхода экстрактивных веществ в процессе извлечения БАВ из плодовых тел гриба *Fomes fomentarius* водно-этанольной смесью от температуры, времени экстракции, соотношения сырья и экстрагента, концентрации этилового спирта в водно-этанольной смеси $Y_E = f(T, \tau, R, C)$.

Коэффициент корреляции отражает тесноту связи между фактором (время экстракции / температура экстракции / соотношение сырья к экстрагенту / концентрация экстрагента) и функцией (выход экстрактивных веществ) [37].

Результаты многофакторного анализа технологических параметров процесса извлечения БАВ из плодовых тел гриба *F. fomentarius* водно-этанольной смесью показывают, что температура экстракции и концентрация экстрагента являются более значимыми параметрами, чем соотношение сырья к экстрагенту и общее время экстракции.

Таким образом, результаты исследований показывают, что оптимальными параметрами процесса получения этанольного сухого экстракта из *F. fomentarius*

являются: температура 60 °С, концентрация этилового спирта в экстрагенте 70%, соотношение сырья к экстрагенту 1:50, общее время экстракции 4 часа, кратность экстрагирования – 4, степень измельчения сырья – до размера сырья, прошедшего через фильтр с размером пор 1 мм. На основании вышеприведенных результатов автором была разработана методика выделения спирторастворимых БАВ.

Разработанная методика получения спиртового извлечения: 10 г сырья помещали в коническую колбу, вместимостью 250 мл, добавляли 150 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывали ватно-марлевой пробкой. Экстрагировали на водяной бане при температуре 60 °С в течение 1 часа. Далее извлечение отделяли от сырья. Учитывая, что размер частиц сырья не превышает 1 мм, фильтровали, используя вакуумный насос, через стеклянный фильтр (размер пор 10-16 мкм) в колбу Бунзена. При получении экстракта из культивируемого мицелия для отделения жидкого экстракта от сырья суспензию подвергали центрифугированию при 4-5 тыс. об./мин в течение 5-10 минут, далее надосадочную жидкость фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор 10-16 мкм). Сырье отжимали. Отжатое сырье максимально переносили в колбу, прибавляли 150 мл 70% этилового спирта. Экстрагировали при температуре 60 °С в течение 1 часа. Извлечение фильтровали через стеклянный фильтр. К отжатому сырью прибавляли 100 мл 70% этилового спирта. Экстрагировали при температуре 60 °С на водяной бане в течение 1 часа. После фильтрования к отработанному сырью прибавляли 100 мл 70% этилового спирта и экстрагировали при температуре 60 °С в течение 1 часа. Экстракт фильтровали, сырье промывали 10-15 мл 70% этанола. Все извлечения объединяли, упаривали на ротационном испарителе и досушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С.

По разработанной технологии получения этанольного экстракта в ГНЦ ВБ ВЕКТОР утверждена стандартная операционная процедура (СОП № № 3-039/01-16) «Получение сухого спиртового извлечения из грибного сырья».

3.1.2 Оптимизация технологии получения водного экстракта

Для выделения БАВ, растворимых в воде, требовалось разработать технологию получения водного экстракта из высших базидиомицетов на примере гриба *Fomes fomentarius*.

В экспериментах оптимизировали параметры процесса экстракции: температуру и время. Учитывали некоторые предварительно установленные оптимальные параметры процесса получения этанольного экстракта: соотношение сырья к экстрагенту (1:50), степень измельчения сырья (1 мм) и кратность экстрагирования (2), которые оставались постоянными.

В таблице 8 показан выход экстрактивных веществ при температурах 25 °С, 60 °С, 70 °С, 80 °С, 95 °С в процессе экстракции дробной мацерацией 2-кратно, общее время экстракции – 4 часа.

Таблица 8 – Выход водорастворимых экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* в зависимости от температуры

Температура экстракции T , °С	Выход экстрактивных веществ Y_w , % ($M \pm m$)($n=3$)
25	$3,1 \pm 0,1^@$
60	$4,1 \pm 0,1^{*@}$
70	$3,8 \pm 0,2^{*@}$
80	$4,3 \pm 0,2^{*@}$
95	$5,8 \pm 0,1^*$

Примечания: T – температура; Y_w – выход экстрактивных веществ; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для $T = 25$ °С, при $p \leq 0,05$; @ – отличие от показателя для $T = 95$ °С при $p \leq 0,05$.

На основании результатов, показанных в таблице 8, выявлена прямая зависимость выхода веществ, экстрагируемых водой, от температуры процесса экстракции при постоянном времени экстракции $Y_w = f(T)$. Показано, что выход экстрактивных веществ при температуре 95 °С достоверно выше показателей выхода экстрактивных веществ при температурах 25 °С, 60 °С, 70 °С и 80 °С. Исходя из этого, сделан вывод, что оптимальной температурой экстрагирования водорастворимых БАВ следует считать 95 °С.

В таблице 9 показан выход экстрактивных веществ при времени процесса экстрагирования 2, 4 и 8 часов при постоянной температуре процесса 95 °С.

Таблица 9 – Выход водорастворимых экстрактивных веществ из плодовых тел *Fomes fomentarius* в зависимости от времени экстракции

Время экстракции общее τ , ч	Выход экстрактивных веществ Y_w , % ($M \pm m$)($n=3$)
2	5,7 \pm 0,2
4	5,8 \pm 0,1
8	5,7 \pm 0,3

Примечания: τ – общее время; Y_w – выход экстрактивных веществ; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов.

Из результатов, приведенных в таблице 9, видно, что при повышении общего времени экстрагирования относительно 2 часов в 2 и 4 раза выход экстрактивных веществ достоверно не увеличивается. Исходя из вышесказанного, оптимальное время экстракции – 2 часа.

Таким образом, оптимальными параметрами процесса получения водного экстракта из *Fomes fomentarius* являются: температура 95 °С, соотношение сырья к экстрагенту 1:50, общее время экстракции 2 часа, кратность экстрагирования – 2, степень измельчения сырья – до 1 мм. На основании установленных параметров автором была разработана методика выделения водорастворимых БАВ.

Разработанная методика получения водного извлечения: 10 г сырья помещали в круглодонную колбу, вместимостью 500 мл, прибавляли 300 мл воды очищенной, смесь нагревали при температуре 95 °С в колбе с обратным холодильником в течение 1 часа, отделяли экстракт от сырья фильтрованием через стеклянный фильтр (размер пор 10-16 мкм). При получении экстракта из культивируемого мицелия для отделения жидкого извлечения от сырья суспензию подвергали центрифугированию при 4-5 тыс. об./мин в течение 5-10 минут, далее надосадочную жидкость фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор 10-16 мкм). Процедуру экстракции повторяли с 200 мл воды. Охлажденные экстракты упаривали и сушили при температуре 60 °С.

Технологию получения сухих этанольных и водных экстрактов из *Fomes fomentarius* апробировали на плодовых телах и культивируемом мицелии высших базидиомицетов и нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* (таблица 10).

Таблица 10 – Перечень грибов, из которых были получены сухие экстракты по разработанной автором технологии выделения комплекса БАВ

№	Название научное	Название тривиальное	Вид сырья
1	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Lam.	Красный мухомор	Плодовое тело
2	<i>Bjerkandera adusta</i> (Willd.) P. Karst.	Бьеркандера опаленная	Плодовое тело
3	<i>Cerrena unicolor</i> (Bull.) Murrill	Церрена одноцветная	Плодовое тело
4	<i>Coprinus comatus</i> (O.F.Müll.) Pers.	Навозник лохматый	Плодовое тело
5	<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolton) J. Schröt.	Дедалеопсис бугристый	Плодовое тело
6	<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolton) J. Schröt.	Дедалеопсис бугристый	Мицелий
7	<i>Daedaleopsis tricolor</i> (Bull.) Bondartsev et Singer	Дедалеопсис трехцветный	Плодовое тело
8	<i>Daedaleopsis tricolor</i> (Bull.) Bondartsev et Singer	Дедалеопсис трехцветный	Мицелий
9	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	Зимний опенок	Плодовое тело
10	<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	Трутовик настоящий	Плодовое тело
11	<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	Трутовик настоящий	Мицелий
12	<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	Трутовик окаймленный	Плодовое тело
13	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Трутовик плоский	Плодовое тело
14	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	Трутовик серно-желтый	Плодовое тело
15	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	Дождевик грушевидный	Плодовое тело
16	<i>Phallus impudicus</i> (L.)	Веселка обыкновенная	Плодовое тело
17	<i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quel.	Трутовик ложный	Плодовое тело
18	<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.) P. Karst.	Трутовик березовый	Плодовое тело
19	<i>Steccherinum ochraceum</i> (Pers.) Gray	Стекхеринум охряный	Плодовое тело
20	<i>Trametes ochracea</i> (Pers.) Gilb. et Ryvarden	Трутовик охряный	Плодовое тело
21	<i>Trametes suaveolens</i> (L.) Fr.	Трутовик душистый	Плодовое тело
22	<i>Trametes trogii</i> Berk.	Трутовик Трога	Плодовое тело
23	<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	Трутовик разноцветный	Плодовое тело
24	<i>Trichaptum biforme</i> (Fr.) Ryvarden	Трихаптум двоякий	Плодовое тело
25	<i>Duddingtonia flagrans</i> (Dudd.) R.C. Cooke	Дуддингтония флагранс	Мицелий

Заключение к п. 3.1

Разработана и оптимизирована технология выделения широкого спектра БАВ (полисахариды, белки, фенольные соединения, флавоноиды и др.) из высших базидиомицетов на основе ксилотрофного гриба *Fomes fomentarius*, апробированная на нескольких десятках грибов.

Проведен многофакторный анализ технологических параметров экстрагирования БАВ из плодовых тел ксилотрофного гриба *F. fomentarius*. Для оценки значимости технологических параметров рассчитывали коэффициент корреляции. Выявлено, что температура экстракции и концентрация экстрагента являются наиболее важными параметрами процесса получения спиртового экстракта. При этом общее время экстракции является менее значимым параметром, т.к. при существенном увеличении общего времени экстракции наблюдается незначительный прирост выхода экстрактивных веществ из гриба и снижение содержания в сухих экстрактах БАВ фенольной природы, таких как флавоноиды.

В результате проведения многофакторного анализа на примере ксилотрофного гриба *F. fomentarius* выявлена зависимость выхода БАВ из грибного сырья от разных технологических параметров.

Таким образом, разработанную технологию получения водных и этанольных экстрактов из базидиального гриба *F. fomentarius* предлагается применить в технологии создания лекарственных препаратов из ряда высших базидиомицетов.

3.2 Биотехнологические аспекты культивирования *Daedaleopsis tricolor*

3.2.1 Введение в культуру *Daedaleopsis tricolor*

Достижения в области биотехнологии, привели к созданию культивируемых штаммов ряда базидиальных грибов. Получение эффективных и продуктивных штаммов в чистой культуре дает возможность использовать введенные в чистую культуру штаммы базидиомицетов для получения биомассы мицелия гриба в промышленных условиях.

Процесс перевода природного объекта в чистую культуру нацелен как на создание штаммов-продуцентов для нужд биотехнологии, так и на благородную миссию сохранения биоразнообразия природы.

Для создания биотехнологических препаратов необходимы эффективные штаммы-продуценты биомассы и БАВ. В качестве одного из таких источников перспективен дереворазрушающий базидиомицет Дедалеопсис трехцветный *Daedaleopsis tricolor*.

Высший базидиомицет *D. tricolor* является сравнительно малоизученным объектом. Ранее некоторые исследователи классифицировали его как разновидность вида *Daedaleopsis confragosa*. В настоящее время *D. tricolor* выделяют в отдельный вид, учитывая существенные отличия от *D. confragosa*. Например, у плодовых тел гриба *D. tricolor* гименофор пластинчатый, а у *D. confragosa* – лабиринтовидный, кроме того, размер плодовых тел *D. tricolor* как правило в 1,5-2 раза меньше и их окраска более яркая [2]. Следует отметить, что вид *D. confragosa* распространен на валеже и сухостое ивы, осины и рябины, в то время как *D. tricolor* чаще встречается на валеже и сухостое березы [59].

На основании литературных данных выявлено, что метаболиты из плодовых тел гриба *D. tricolor* проявляют противоопухолевую [147; 179] антиоксидантную, и слабую антибактериальную активность [153]. При этом публикации, посвященные исследованию данного гриба в чистой культуре и культивированию на питательных средах, крайне малочисленны.

Гриб *D. tricolor* является несъедобным и поэтому не используется в пищевой промышленности.

Наличие выявленной биологической активности [147; 153; 179] делает данный гриб перспективным для перевода в чистую культуру и выращивания в стационарных и динамических условиях.

3.2.1.1 Характеристика плодовых тел гриба *Daedaleopsis tricolor*

Собранные для работы плодовые тела базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* однолетние, сидячие, веерообразные, приросшие боком, до 6×10 см, гименофор пластинчатый, гифальная система тримитическая. Гриб вызывает белую гниль лиственных пород деревьев [2]. У грибов, собранных с погибшей березы повислой *Betula pendula* шляпка темно красновато-коричневого цвета, в то время как у грибов собранных с ивы белой *Salix alba* шляпка имела светло-коричневый цвет с красноватым оттенком. Кроме того, плодовые тела гриба, субстратом которого была ива, имели немного больший размер, чем плодовые тела с березы.

В чистую культуру выделены три штамма базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* из плодовых тел, собранных в лесных массивах Новосибирской области с субстратов, наиболее специфичных для рода *Daedaleopsis* [59]. Штамм Db-14 выделен из плодовых тел, собранных близ села Вьюны в Колыванском районе с погибшей березы *Betula pendula* в августе 2013 года; штамм Db-18 – из плодовых тел, в окрестностях поселка Кольцово в Новосибирском районе с березы *Betula pendula* в сентябре 2013 года; штамм Dr-17 – из плодовых тел, в окрестностях поселка Кольцово с ивы *Salix alba* в сентябре 2013 года.

Выделение в культуру гриба проводилось из тканей плодового тела преимущественно из гимениального слоя. Кусочки плодового тела помещали на агаризованную питательную среду в чашки Петри. Молодой растущий мицелий базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* (штаммы Db-14, Db-18 и Dr-17) появился на агарозной среде на 7-8 сутки с момента посева.

3.2.1.2 Изучение культурально-морфологических свойств

Исследуя культурально-морфологические особенности выделенных в культуру штаммов *Daedaleopsis tricolor*, выявлено, что в культуре они образуют плотные колонии сначала белого, а на 16-18 сутки роста – песочного или коричневого цвета. Скорость роста мицелия на овсяном отваре агаризованном (ООВА) составила 3,4-3,6 см за 4 суток, на МКА – 2,6-2,8 см за 4 суток. Однако на среде с меллассой, кукурузным экстрактом и агаром (МКА) наблюдается более плотный рост колоний, чем на ООВА.

При микроскопическом исследовании (увеличение в 400 и 1000 раз) мицелия гриба штаммов Db-14, Db-18 и Dr-17 наблюдается слабо разветвленный, септированный мицелий с многочисленными пряжками одиночного типа, генеративные гифы бесцветные.

На рисунках 5 (а-е), 6 (а-е), 7 (а-е) показаны: плодовые тела, из которых были выделены штаммы, колонии гриба на чашке Петри, микроскопические фотографии мицелия *Daedaleopsis tricolor*, выращенного в чистой культуре на глюкозопептонной среде (ГПС) глубинным и поверхностным методом.



Рисунок 5а – Плодовое тело *D. tricolor* на субстрате, штамм Db-14

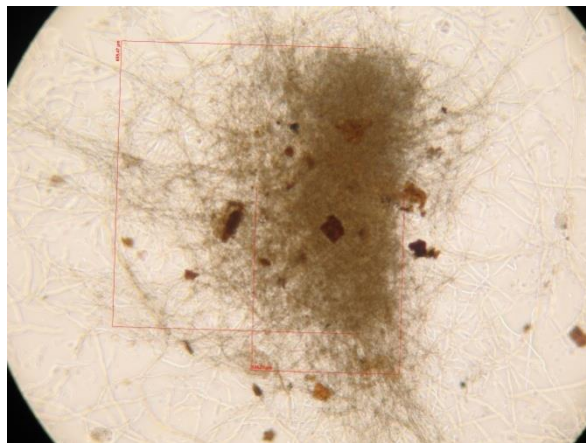


Рисунок 5б – Плодовое тело *D. tricolor* измельченное, штамм Db-14 (фото Косоговой Т.А.)

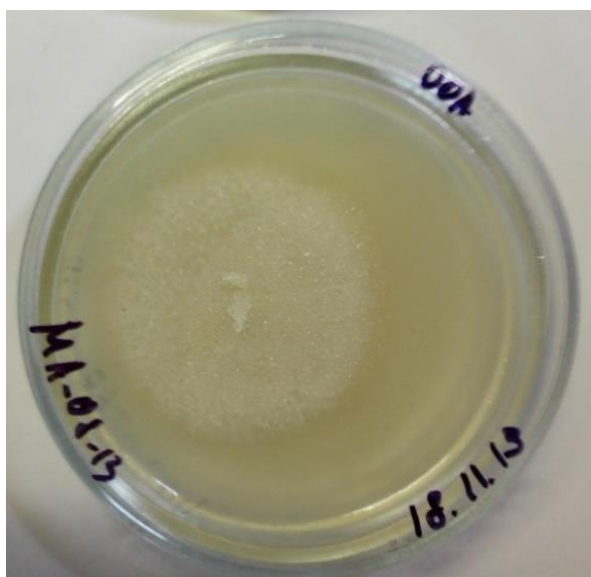


Рисунок 5в – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с ООА, штамм Db-14



Рисунок 5г – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с МКА, штамм Db-14

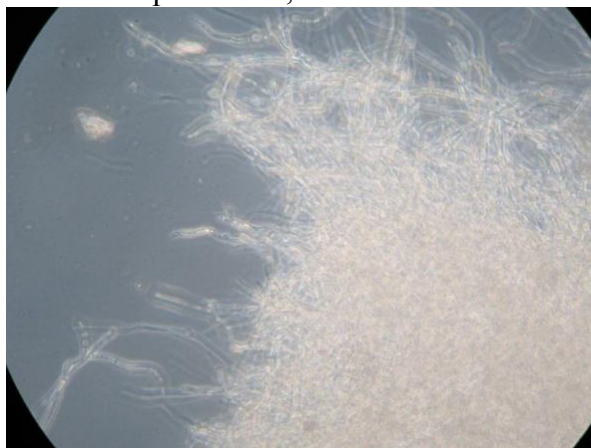


Рисунок 5д – Культура гриба *D. tricolor* штамм Db-14 в ГПС, глубинное культивирование (фото Косоговой Т.А.)

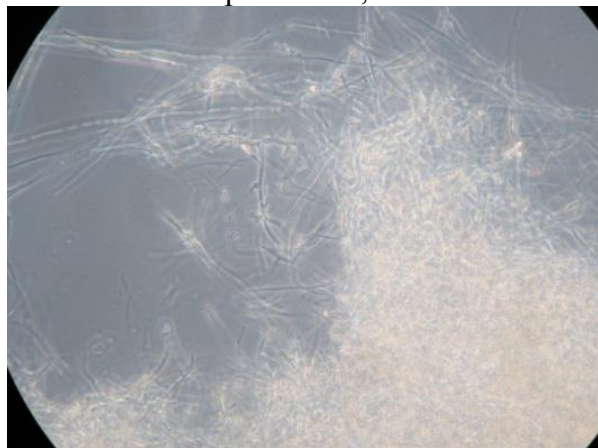


Рисунок 5е – Культура гриба *D. tricolor* штамм Db-14 в ГПС, поверхностное культивирование (фото Косоговой Т.А.)



Рисунок 6а – Плодовое тело *D. tricolor* на субстрате, штамм Db-18



Рисунок 6б – Плодовое тело *D. tricolor* измельченное, штамм Db-18 (фото Косоговой Т.А.)

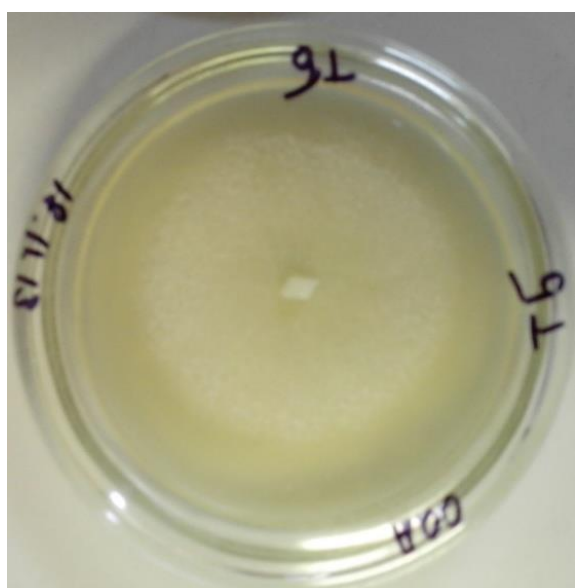


Рисунок 6в – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с ООА, штамм Db-18



Рисунок 6г – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с МКА, штамм Db-18

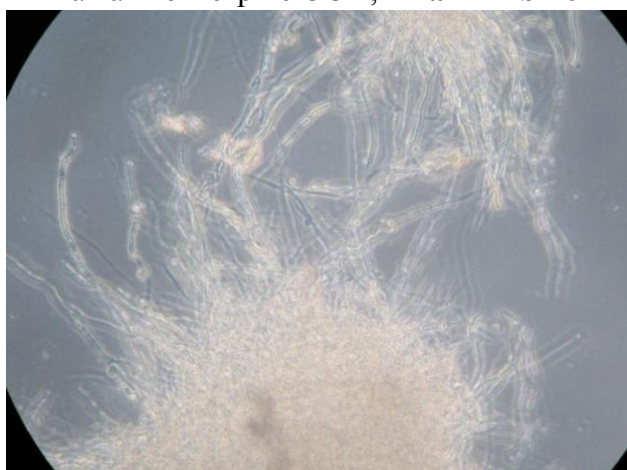


Рисунок 6д – Культура гриба *D. tricolor* штамм Db-18 в ГПС, глубинное культивирование (фото Косоговой Т.А.)

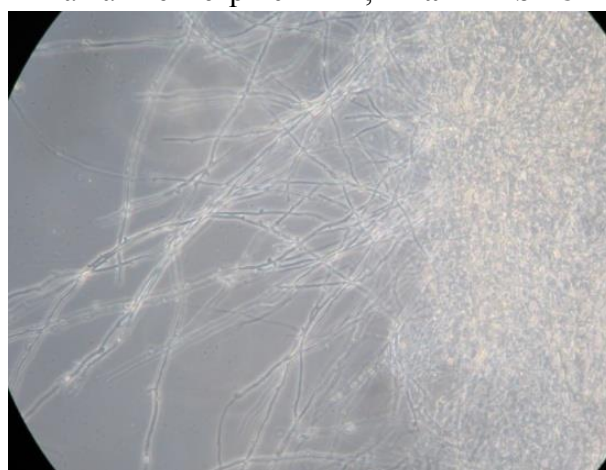


Рисунок 6е – Культура гриба *D. tricolor* штамм Db-18 в ГПС, поверхностное культивирование (фото Косоговой Т.А.)



Рисунок 7а – Плодовое тело *D. tricolor* на субстрате, штамм Dr-17



Рисунок 7б – Плодовое тело *D. tricolor* измельченное, штамм Dr-17 (фото Косоговой Т.А.)

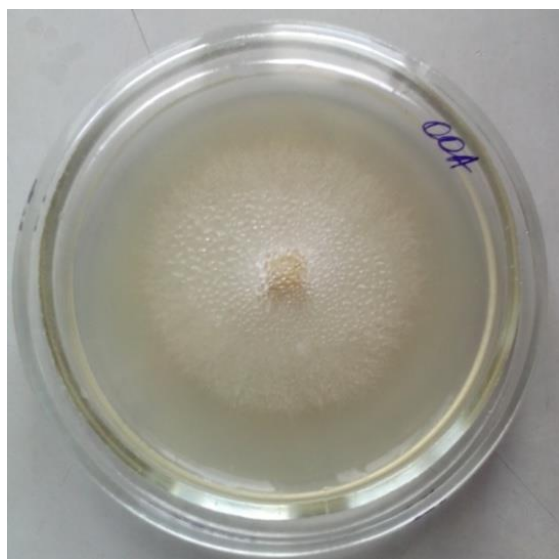


Рисунок 7в – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с ООА, штамм Dr-17

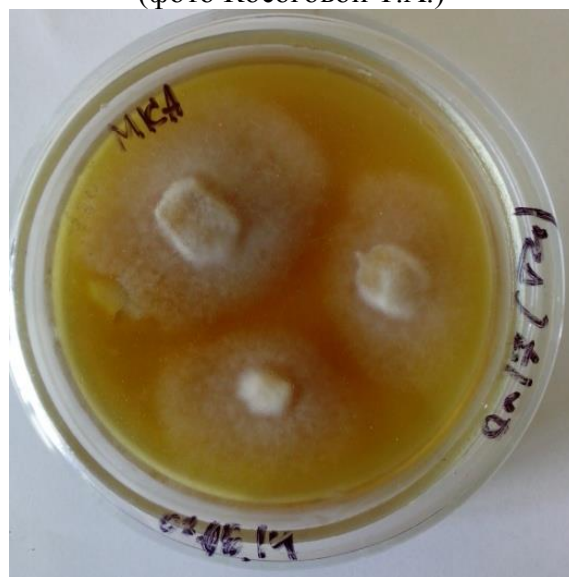


Рисунок 7г – Колония *D. tricolor* на чашке Петри с МКА, штамм Dr-17

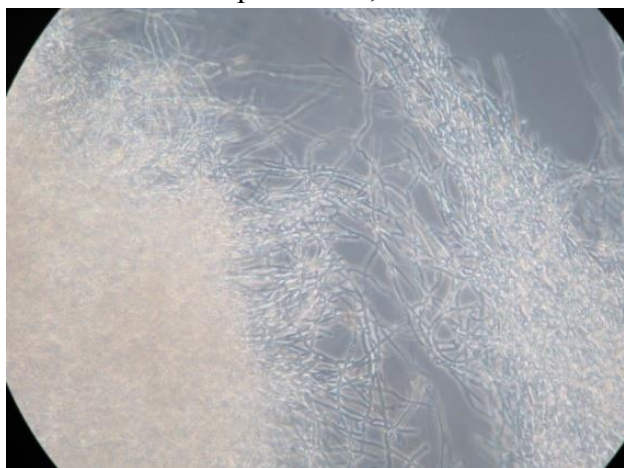


Рисунок 7д – Культура гриба *D. tricolor* (штамм Dr-17) на ГПС, глубинное культивирование, (фото Косоговой Т.А.)



Рисунок 7е – Культура гриба *D. tricolor* штамм Dr-17 на ГПС, поверхностное культивирование (фото Косоговой Т.А.)

3.2.1.3 Очистка от микофильных организмов

Микофильные грибы – это экологическая группа микроскопических грибов, отличительной особенностью которых является способность использовать в качестве субстрата питания другие грибы, в том числе и фитопатогенные.

Микофильные грибы часто присутствуют в культурах многих грибов длительное время в форме мицелия. В связи с тем, что микофильные микромицеты наносят вред введенным в культуру грибам (что особенно проявляется при длительном хранении их в коллекции), необходимо очистить культуру от них с помощью серии пересевов на чашки с агаризованной средой [14; 71].

Для выявления микофильных грибов в культурах мицелий из колоний возраста от 3 недель микроскопировали при разных увеличениях ($\times 400$, $\times 1000$) во временных препаратах, изготовленных методом «раздавленной капли» [71]. Микофильные грибы были выявлены изначально во всех трех штаммах гриба *Daedaleopsis tricolor*. С помощью пересевов из одной чашки агаризованной среды в другую были получены культуры гриба, очищенные от микофильных организмов.

На рисунках 8-11 показаны микофильные грибы в культуре гриба *Daedaleopsis tricolor* штаммов Db-14, Db-18 и Dr-17 при увеличении в 1000 раз (показаны стрелками). Возраст колоний составлял 1 месяц и более.

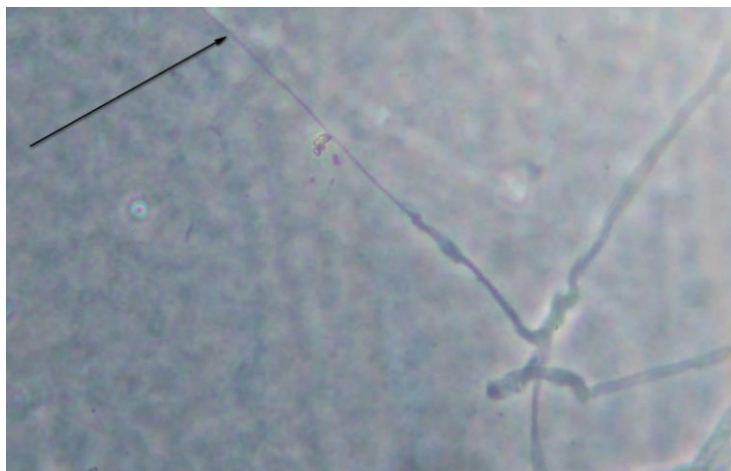


Рисунок 8 – Культура гриба *Daedaleopsis tricolor* (штамм Db-14) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес. (фото Косоговой Т.А.)

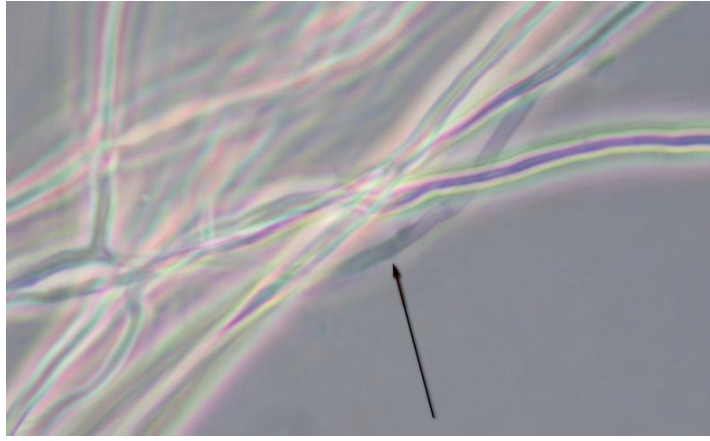


Рисунок 9 – Культура гриба *Daedaleopsis tricolor* (штамм Db-18) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес. (фото Косоговой Т.А.)

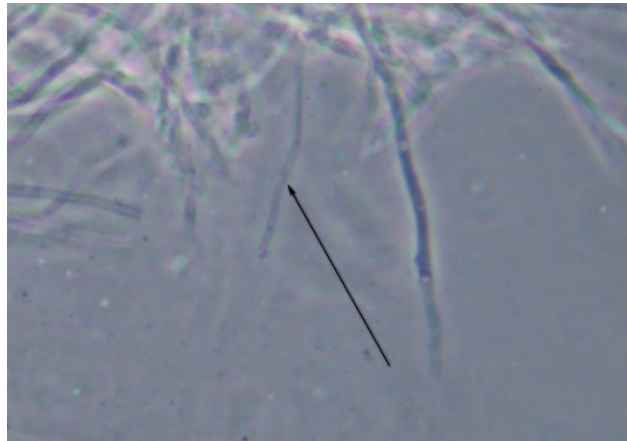


Рисунок 10 – Культура гриба *Daedaleopsis tricolor* (штамм Dr-17) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес. (фото Косоговой Т.А.)

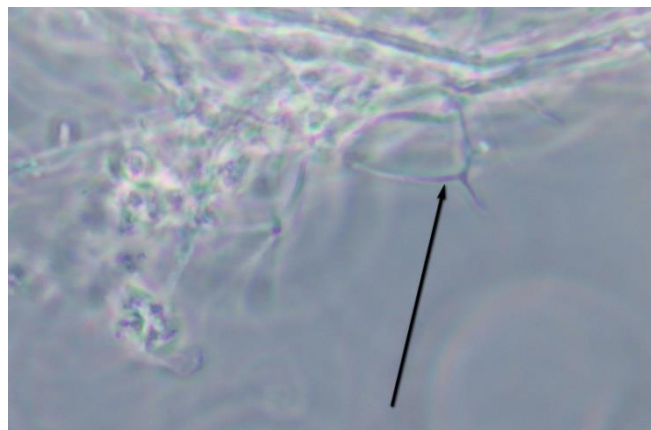


Рисунок 11 – Культура гриба *Daedaleopsis tricolor* (штамм Dr-17) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 2 мес. (фото Косоговой Т.А.)

Для хранения чистые культуры гриба *Daedaleopsis tricolor* засевали в биологические пробирки с 20 мл скошенного овсяного отвара агаризованного. Далее пробирки выдерживали в термостате при температуре 25 ± 2 °С до полного обрастания поверхности агаризованной среды мицелием (рисунок 12). Хранение штаммов на скошенном агаре осуществляли при температуре (2-4) °С в условиях холодильника. Пересев культур осуществляли 1 раз в год. При пересеве проводили микроскопический контроль мицелия.

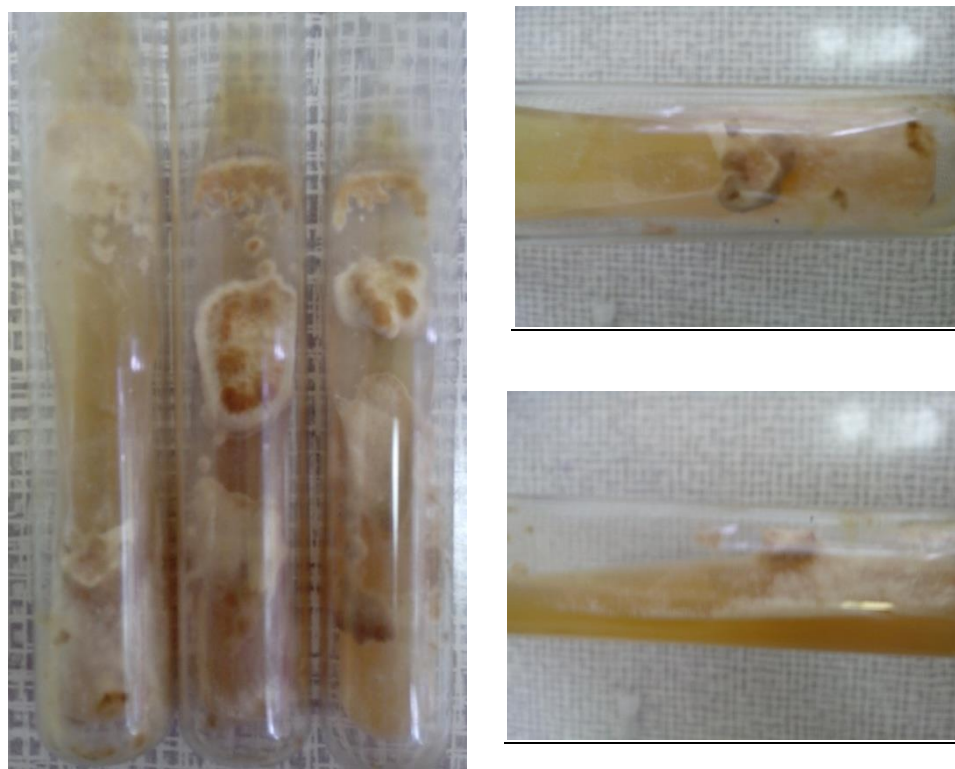


Рисунок 12 – Гриб *Daedaleopsis tricolor* (штамм Db-18) на скошенном агаре.
Видны зачатки плодовых тел

3.2.2 Технология выращивания биомассы *Daedaleopsis tricolor* методами погруженного и поверхностного культивирования

Культивируемые грибы во многих случаях сохраняют способность к синтезу БАВ. Однако при этом обычно наблюдаются как количественные, так и качественные изменения в составе комплекса синтезируемых БАВ.

Биотехнологические приемы, такие как оптимизация состава питательной среды и условий культивирования (температура, pH, скорость вращения и т.д.), позволяют воздействовать на биосинтетическую активность, и контролировать качество и выход конечного продукта.

Состав среды

Одним из важнейших этапов разработки технологии получения грибной биомассы мицелия в чистой культуре является оптимизация состава жидких питательных сред.

Для роста мицелия и биосинтеза им БАВ необходимы источники питания, а именно углерод, азот, водород, неорганические соли и симуляторы роста [71].

Известно, что глюкозопептонная среда предназначена для культивирования дереворазрушающих грибов в жидкой питательной среде [35; 91]. Данную среду использовали для культивирования биомассы гриба *Daedaleopsis tricolor* в работе Zhao J.Y. [228], а также для выращивания других ксилотрофных базидиомицетов, таких как *Flammulina velutipes*, *Fomes fomentarius*, *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat, *Trametes trogii*, *Daedalea quercina* (L.) Pers., *Laetiporus sulphureus* [111; 112].

Для выращивания ксилотрофных грибов, таких как *Pleurotus ostreatus* и *Laetiporus sulphureus*, перспективна жидкая питательная среда, содержащая в качестве источника углерода крахмал [47; 92], а в качестве источника азота – кукурузный экстракт [92]. Это связано с тем, что базидиомицеты способны использовать крахмал с помощью синтезируемой ими α -амилазы.

В работах [6; 96] описывается глубинное культивирование базидиомицетов *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Ganoderma lucidum*, *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead, *Hypsizygus marmareus* (Peck) H.E. Bigelow, *Flammulina velutipes*, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo, *Trametes versicolor*, *Pleurotus djamor* (Rumph.

ex Fr.), *P. ostreatus*, *Lentinula edodes* на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и неорганические соли. Следует отметить, что использование соевой муки значительно удешевляет стоимость питательной среды.

На основании литературных данных для выращивания биомассы мицелия гриба методами поверхностного и глубинного культивирования *Daedaleopsis tricolor* выбраны питательные среды: среда с глюкозой и соевой мукой (ГС), среда с крахмалом и кукурузным экстрактом (ККЭ) и глюкозопептонная среда (ГПС). Состав сред указан в таблице 11.

Таблица 11 – Состав питательных сред для культивирования гриба *Daedaleopsis tricolor*

Среда	Содержание компонентов питательной среды, г/л									
	Меласса	Крахмал	Кукурузный экстракт	Глюкоза	Соевая мука	Пептон	Дрожжевой экстракт	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄
ГПС	-	-	-	30	-	5	2	1	0,5	-
ККЭ	-	45	15	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5
ГС	-	-	-	30	15	-	-	2	0,3	-

Примечания: ГПС – глюкозопептонная среда; ККЭ – среда с крахмалом и кукурузным экстрактом; ГС – среда с глюкозой и соевой мукой.

Температурный режим

Известно, что при культивировании высших базидиомицетов температурный оптимум, как правило, находится в пределах 22-28 °С [14]. С учетом известного факта, что гриб *Daedaleopsis tricolor* растет преимущественно в летний и осенний периоды, для культивирования был выбран интервал температуры от 24 до 28 °С.

Оптимум pH

Известно, что большинство базидиомицетов в культуре развивается при pH 5,0-6,0 [71]. В работе Zhao J.Y. [228] описывается культивирование гриба

Daedaleopsis tricolor при pH 6,0. На основании этого для выращивания биомассы мицелия исследуемого гриба был установлен оптимум pH $6,0 \pm 0,5$.

Аэрация

На аэрацию культуры гриба в жидкой питательной среде при культивировании на ротационной качалке влияют скорость вращения и объем среды в колбе.

Для суспензионного культивирования грибов на ротационной качалке в колбах или во флаконах, объем питательной среды в них составляет обычно в 5 раз меньше объема сосуда [71].

Во флаконы для культивирования вместимостью 500 мл помещали по 80 мл питательной среды и 20 мл посевного мицелия гриба.

Скорость вращения круговых качалок, применяемых для культивирования грибов, составляет, как правило, от 100 до 290 об./мин [71]. Для глубинного культивирования гриба была выбрана частота вращения равная 190 об./мин.

Таким образом, на основании представленных литературных данных, установлены параметры культивирования ксилотрофного гриба *Daedaleopsis tricolor* на жидкой питательной среде.

Процесс **глубинного** культивирования проводили во флаконах, емкостью 500 мл в 100 мл питательной среды на ротационной качалке при скорости вращения 190 об./мин, при температуре 26 ± 2 °C, pH $6,0 \pm 0,5$, инкубируя в течение 5 (штамм Db-14) или 7 суток (штаммы Db-18 и Dr-17), используя в качестве посевного материала 2-х (штамм Db-14) или 3-х (штаммы Db-18 и Dr-17) суточный инокулят глубинной культуры, выращенный на той же среде, в количестве 20% по объему.

Засев на жидкую питательную среду для наработки посевного жидкофазного мицелия (инокулята) проводили кусочками 6-7 суточного мицелия, выращенного на ООА. Для этого во флаконы с 80 мл питательной среды помещали по 20 круглых блоков, вырезанных с агара с молодым мицелием, диаметром 5 мм.

В глубинной культуре мицелий, полученный на основе выделенных в чистую культуру штаммов Db-14, Db-18 и Dr-17, образовывал пеллеты диаметром от 0,3 до 1,0 см песочного цвета. При выращивании на средах ГПС и ГС культуральная жидкость имела окраску от темно-оранжевого до коричневого цвета, предположительно, обусловленную наличием в ней пигментов полифенольного ряда. При культивировании на ККЭ культуральная жидкость была преимущественно светло-коричневой (рисунок 13).

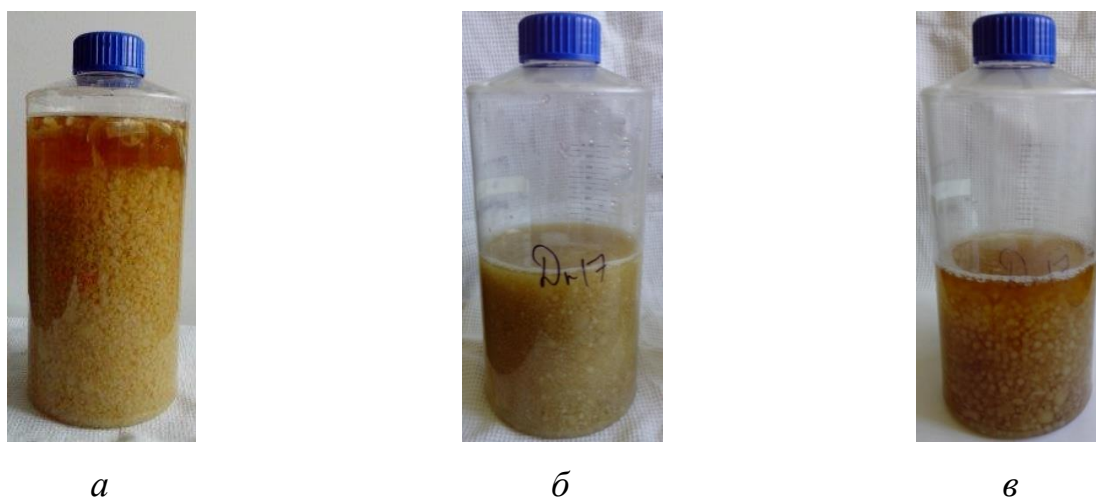


Рисунок 13 – *Daedaleopsis tricolor* (штамм Dr-17), 5-7 суток глубинного культивирования на ГПС (а), ККЭ (б) и ГС (в). Объем 1,2-2,4 л.

Полученную биомассу отделяли фильтрованием через капроновую ткань и бумажный фильтр, а затем отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой и высушивали при температуре 60 °С. Высушенный мицелий измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, измеряли массу сухого мицелия и рассчитывали содержание сухой биомассы культивируемого мицелия в пересчете на 1 л питательной среды.

Для **поверхностного** культивирования на жидкой среде гриба *Daedaleopsis tricolor* на основе выделенных автором штаммов Db-14, Db-18 и Dr-17 использовали те же питательные среды, что и для глубинного культивирования: ГПС, ККЭ, ГС.

Культивирование в стационарных условиях проводили во флаконах, емкостью 500 мл в 80-100 мл жидкой питательной среды. Флаконы с жидкой

питательной средой засеивали 6-7 суточной культурой, полученной на МКА или ООА в чашках Петри. Для роста мицелия флаконы оставляли в горизонтальном положении. Культивирование осуществляли при комнатной температуре без доступа света в течение 27 суток. По окончании 27 суток флаконы переносили в помещение с рассеянным светом, где оставляли еще на 6 суток для стимулирования выработки пигментов, в том числе и меланинов. Общее время культивирования составило 33 суток.

Выращенный на ГПС плотный мицелий гриба *D. tricolor* был преимущественно белого цвета, толщиной плотной части 2-4 мм. Мицелий гриба был как полностью распростертым по поверхности питательной среды (штаммы Db-14 и Db-18), так и занимающий примерно от $\frac{1}{2}$ до $\frac{3}{4}$ поверхности жидкой среды, при этом некоторое количество мицелия гриба находилось погруженным в среду (штамм Dr-17).

Белый, почти белоснежный, мицелий гриба *D. tricolor*, выращенный поверхностным способом на ККЭ, занимал практически всю поверхность среды и почти не был погружен в жидкую среду. При этом толщина плотной части составляла до 3 мм.

Культивируемый мицелий *D. tricolor*, полученный на ГС, был частично погружен в среду и был почти полностью распростертым по поверхности. Мицелий имел преимущественно белую окраску, реже – оранжевую и желтовато-коричневую (рисунок 14).



а



б



в



г



д



е

Рисунок 14 – *Daedaleopsis tricolor*, 32-33 суток поверхностного культивирования на ГПС: штамм Dr-17 (а) и штамм Db-18 (б); на ККЭ: штамм Db-14 (в) и штамм Db-18 (г); на ГС штамм Db-14 (д) и штамм Db-18 (е)

Выращенный суспензионным и поверхностным способом мицелий *Daedaleopsis tricolor* подвергали микроскопическому контролю. Полученную биомассу отделяли от культуральной жидкости, используя капроновую ткань и бумажный фильтр, отмывали от остатков среды дистиллированной водой и высушивали при температуре 60 °С в термостате. Сухую биомассу мицелия измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния.

Содержание сухой биомассы, полученной методами поверхностного и глубинного культивирования *D. tricolor* штаммов Db-14, Db-18, Dr-17 показано в таблице 12.

Таблица 12 – Содержание сухой биомассы мицелия при культивировании *Daedaleopsis tricolor* в динамических и стационарных условиях

Среда	Содержание сухой биомассы, г/л ($M \pm m$)(n=3)					
	Глубинное культивирование			Поверхностное культивирование		
	Штамм Db-14	Штамм Db-18	Штамм Dr-17	Штамм Db-14	Штамм Db-18	Штамм Dr-17
ГПС	7,4±0,2* [@]	5,1±0,1* [@]	6,4±0,1* [@]	5,6±0,1* [@]	7,7±0,2* [@]	5,7±0,1* [@]
ККЭ	14,4±0,4 [@]	10,6±0,3 [@]	10,3±0,2 [@]	13,0±0,5 [@]	11,2±0,2 [@]	12,9±0,3 [@]
ГС	3,4±0,1*	2,1±0,1*	4,8±0,1*	8,8±0,3*	2,6±0,1*	8,9±0,1*

Примечания: ГПС – глюкозопептонная среда; ККЭ – среда с крахмалом и кукурузным экстрактом; ГС – среда с глюкозой и соевой мукой; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для ККЭ по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от соответствующего показателя для ГС по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Как видно из таблицы 12, наибольший выход биомассы мицелия достоверно наблюдался при культивировании гриба на ККЭ (14,4 г/л), наименьший – на ГС 2,1 г/л. Следует учесть, что среда ГС сравнительно трудна в приготовлении с технологической точки зрения, т.к. соевая мука практически не растворяется в воде.

Отмечено, что для наработки биомассы мицелия поверхностным способом потребовалось в 4 раза больше времени культивирования, чем при глубинном культивировании, при практически равном выходе сухой биомассы гриба.

Кроме того, глубинный способ выращивания базидиомицетов имеет преимущества перед поверхностным методом культивирования, такие как увеличение аэрации вследствие перемешивания культуры, возможность использования промышленных ферментеров, увеличение объема питательной среды и объема конечного продукта.

Учитывая вышеуказанные факторы, можно сделать вывод о том, что глубинное культивирование является более перспективным для разработки технологии культивирования гриба *Daedaleopsis tricolor* в промышленных условиях.

Заключение к п. 3.2

Таким образом, в чистую культуру выделено три штамма из плодовых тел гриба *Daedaleopsis tricolor*, собранных в разных местах произрастания (окрестности села Вьюны и поселка Кольцово), с разных субстратов (береза, ива), в разное время (август 2013 г., сентябрь 2013 г.). Культуры гриба *D. tricolor* очищены от микромицетов с помощью серии пересевов. На основе выделенных штаммов методами глубинного и поверхностного культивирования получена биомасса мицелия *D. tricolor*.

Показано, что для наработки мицелиальной биомассы *D. tricolor* при практически одинаковом выходе сухой биомассы мицелия в стационарных условиях потребовалось в 4 раза больше времени культивирования, чем при культивировании в динамических условиях.

Глубинное культивирование является наиболее перспективным для разработки технологии выращивания мицелия *D. tricolor* в промышленных условиях, т.к. оно имеет преимущества перед поверхностным культивированием, а именно: временной фактор, увеличение объема питательной среды и, как следствие, объема конечного продукта и возможность использования промышленных ферментеров.

3.3 Разработка методик анализа препаратов из высших базидиомицетов

Одним из важнейших этапов создания лекарственных препаратов является разработка методов их стандартизации по группам БАВ. Инструментальные методы анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и позволяют устанавливать структуру БАВ. При этом используется дорогостоящее оборудование, требующее затратной по времени и ресурсам пробоподготовки. Для стандартизации разрабатываемых лекарственных препаратов на основе грибного и растительного сырья требуется разработать экспресс-методики количественного определения БАВ с использованием доступного общелабораторного оборудования.

3.3.1 Разработка методик качественного анализа на содержание тритерпенов, каротиноидов и флавоноидов

В процессе разработки методики совместного анализа тритерпенов и каротиноидов, проводили подбор систем растворителей для определения тритерпенов и каротиноидов одновременно. Для этого были использованы следующие системы: бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5); бутанол – уксусная кислота – вода (6:1:2); бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4); бензол: этилацетат 1:1.

Оптимальной системой растворителей выбрана система состава бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4). В качестве проявителя использовали 20% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты в 95%-ном этаноле. При этом тритерпены на пластине окрашиваются в оранжевый или розовый цвет, а каротиноиды в синий.


Для разработки метода качественного анализа флавоноидов в исследуемых препаратах методом ТСХ проводили подбор систем растворителей в качестве подвижной фазы. Для этого были использованы следующие системы: бутанол – уксусная кислота – вода (4: 1:5); бутанол – уксусная кислота (5%) – вода (6:1:2);

бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4); бензол – этилацетат 1: 1.

Оптимальной системой растворителей выбрана система состава этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3). В качестве детектирующего агента использовали УФ-излучение при длинах волн 254 нм и 365 нм, а также 2% спиртовый раствор алюминия хлорида.

Для анализа флавоноидов методом ТСХ приготовили модельную систему, представляющая собой смесь флавоноидов рутин, лютеолин-7-гликозид и диgidрокверцетин. Флавоноиды в системе растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3) разделяются следующим образом: рутин ближе остальных к линии старта, диgidрокверцетин – ближе к линии финиша, а пятно лютеолин-7-гликозида располагается между пятнами диgidрокверцетина и рутина (таблица 13).

Таблица 13 – Модельная система для анализа флавоноидов методом ТСХ в системе растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3)

№	Образцы	Rf фактор	Пластина в видимом свете
1	Модельная система флавоноидов (дигидрокверцетин, рутин и лютеолин-7-гликозид)	0,96 0,71 0,47	
2	Модельная система флавоноидов (дигидрокверцетин, рутин и лютеолин-7-гликозид)	0,96 0,71 0,46	
3	Модельная система флавоноидов (дигидрокверцетин, рутин и лютеолин-7-гликозид)	0,96 0,71 0,46	
4	Дигидрокверцетин	0,96	
5	Рутин	0,48	
6	Лютеолин-7-гликозид	0,72	

Показана воспроизводимость результатов ТСХ как для индивидуальных веществ, так и для модельной смеси из 3 компонентов (таблица 13). Модельная система применима только в системе растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3)

3.3.2 Разработка методик количественного анализа белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из высших грибов

Аналитический этап исследования определяется каждым исследователем в зависимости от аппаратного обеспечения, его трудоемкости, надежности и достоверности. Инструментальные методы анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и позволяют устанавливать структуру БАВ. При этом используется дорогостоящее оборудование, требующее продолжительной и затратной пробоподготовки. Для стандартизации разрабатываемых лекарственных препаратов на основе грибного и растительного сырья требуется разработать экспресс-методики количественного анализа групп БАВ с использованием доступного общелабораторного оборудования.

Анализ литературных данных показал возрастающий интерес к белкам, полисахаридам, фенольным соединениям и флавоноидам грибов в качестве потенциальных лекарственных средств. Исходя из этого, представляется актуальным разработка экспресс-методик количественного анализа этих групп биологически активных соединений в препаратах природного происхождения.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью пакета компьютерных программ анализа данных Microsoft Excel.

3.3.2.1 Разработка методики количественного анализа на содержание белка

Выбор метода. Для разработки методики анализа содержания белка в препаратах из высших грибов выбран метод Бредфорд [123], как наиболее чувствительный и специфичный.

Оптимизация состава реакционной смеси. При разработке методики, подбирали объемы реагентов так, чтобы объем реакционной смеси был равен 1,0 мл. При этом в качестве стандарта использовали раствор БСА в концентрации 25 мкг/мл (опыт 1) и 100 мкг/мл (опыт 2). Результаты измерения оптической плотности реакционных смесей *a, b, c, d, e* приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание белка

Код р.с.	Объем пробы, мкл	Объем РБ, мкл	Опыт 1		Опыт 2	
			Конц-я БСА в р.с., мкг/мл	D ₅₉₅ , о.е.	Конц-я БСА в р.с., мкг/мл	D ₅₉₅ , о.е.
a)	100	900	2,5	0,188	10	0,555
b)	200	800	5	0,191	20	0,586
c)	300	700	7,5	0,514	30	1,015
d)	400	600	10	0,654	40	0,975
e)	500	500	12,5	0,650	50	0,824

Примечания: р.с. – реакционная смесь; конц-я – концентрация; БСА – бычий сывороточный альбумин; РБ – реактив Бредфорд (раствор красителя Кумасси G 250).

В таблице 14 показаны максимальные значения оптической плотности у реакционных смесей «*c*», «*d*» и «*e*». Однако для указанных реакционных смесей отмечено, что при повышении концентрации БСА в 4 раза оптическая плотность увеличивается в 2 раза. Поэтому реакционная смесь «*b*» является оптимальной для обеспечения чувствительности анализа и стабильности результатов.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси «*b*»: в микропробирки на 1,5 мкл вносили 200 мкл анализируемого раствора, добавляли 800 мкл приготовленного раствора Кумасси, аккуратно перемешивали вращательными движениями для предотвращения появления пены. В

контрольную пробирку вносили 200 мкл воды дистиллированной и 800 мкл раствора Кумасси. Измерения проводили не ранее 5 минут, но не позднее часа после внесения красителя Кумасси в пробу на спектрофотометре SmartSpec Plus при длине волны 595 нм. По калибровочному графику определяли концентрацию белка в образцах.

Для построения калибровочного графика стандартный раствор БСА (10 мг/мл) разбавляли водой дистиллированной, получая рабочие растворы с содержанием 18,8; 25; 31,25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100; 125; 150 мкг/мл. Экспериментальные данные по построению калибровочного графика представлены на рисунке 15.

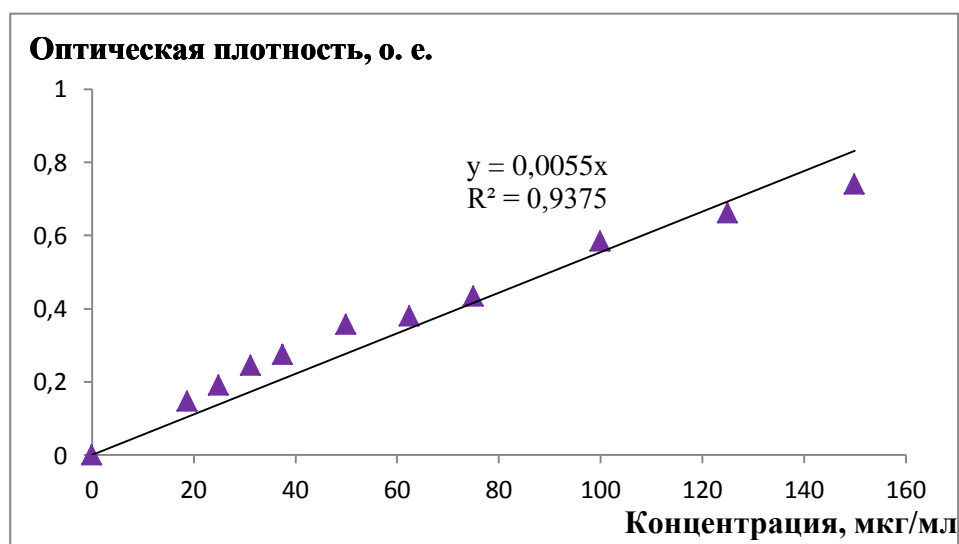


Рисунок 15 – Калибровочный график по БСА

Показано, что в концентрации от 18,8 мкг/мл до 150 мкг/мл зависимость оптической плотности от концентрации БСА в растворе имеет линейный характер.

По разработанной методике анализа содержания полисахаридов в сухих препаратах из высших грибов в ГНЦ ВБ ВЕКТОР утверждена СОП № 2-008/01-12 «Определение содержания белка в препаратах, выделенных из природных источников» (Приложение 1).

3.3.2.2 Разработка методики количественного анализа на содержание полисахаридов

Выбор метода. Для разработки методики анализа содержания полисахаридов в грибных препаратах из высших грибов выбран модифицированный антроновый метод [76].

Оптимизация состава реакционной смеси. Подбирали объемы реагентов так, чтобы объем реакционной смеси был равен 1,0 мл. При этом в качестве стандарта использовали раствор глюкозы в концентрации 50 мкг/мл (опыт 1) и 100 мкг/мл (опыт 2). Результаты измерения оптической плотности приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание полисахаридов

Код р.с.	Объем пробы, мкл	Объем АР, мкл	Объем ЭС, мкл	Опыт 1		Опыт 2	
				Конц-я глюкозы в р.с., мкг/мл	D ₄₃₀ , о.е.	Конц-я глюкозы в р.с., мкг/мл	D ₄₃₀ , о.е.
a)	75	225	700	3,75	0,285	7,5	0,541
b)	100	200	700	5	0,172	10	0,318
c)	100	150	750	5	0,132	10	0,233
d)	150	250	600	7,5	0,247	15	0,361

Примечания: р.с. – реакционная смесь; конц-я – концентрация; АР – 0,2% антроновый реактив; ЭС – 96% этиловый спирт.

В таблице 15 показаны максимальные значения оптической плотности у реакционной смеси «a». Учитывая соответствие повышения оптической плотности увеличению концентрации глюкозы реакционная смесь «a» является оптимальной для проведения анализа содержания полисахаридов.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси «a»: в микропробирки на 1,5 мл вносили 75 мкл раствора экстракта в воде дистиллированной, добавляли 225 мкл 0,2% антронового реактива, перемешивали в шейкере. Кипятили на водяной бане 10 мин. Пробирки охлаждали в холодной проточной воде. Добавляли 700 мкл спирта и каждую пробирку сразу встряхивали в шейкере. В контрольную пробирку вместо раствора образца вносили воду

дистиллированную. Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре SmartСpec Plus при длине волны 430 нм. По калибровочному графику определяли концентрацию полисахаридов в образцах экстрактов грибов.

Для построения калибровочного графика стандартный раствор глюкозы (10 мг/мл) разбавляли водой дистиллированной, получая рабочие растворы с содержанием 18,8; 37,5; 62,5; 75; 100 мкг/мл. Экспериментальные данные по построению калибровочного графика представлены на рисунке 15.

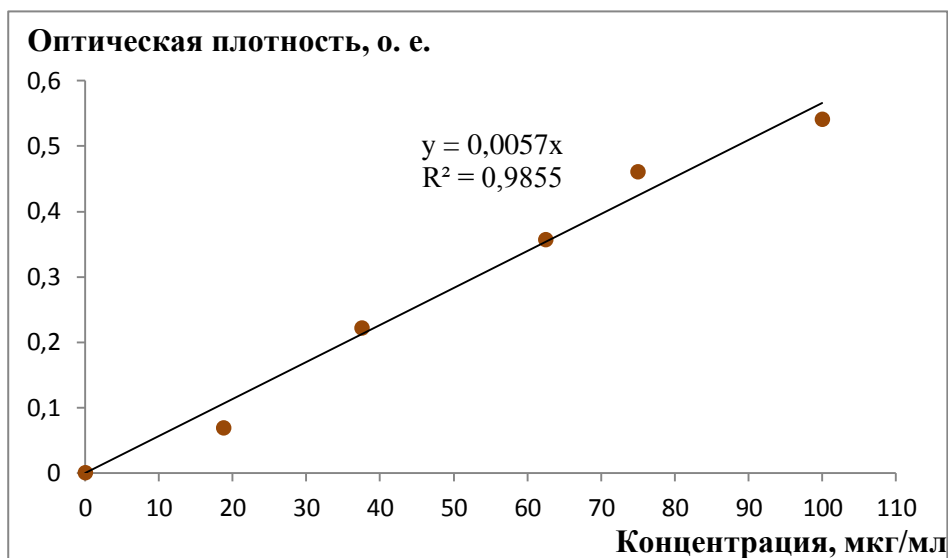


Рисунок 16 – Калибровочный график по глюкозе

Выявлено, что в концентрации от 18,8 мкг/мл до 100 мкг/мл зависимость оптической плотности от концентрации глюкозы в растворе имеет линейный характер.

По разработанной методике анализа содержания полисахаридов в сухих препаратах из высших грибов в ГНЦ ВБ ВЕКТОР утверждена СОП № 3-009/01-12 «Определение содержания полисахаридов в препаратах, выделенных из природных источников» (Приложение 1).

3.3.2.3 Разработка методики количественного анализа на содержание фенольных соединений

Выбор метода. Существует несколько принципиально отличающихся методов количественного определения **фенольных соединений** в фитопрепаратах. К ним относятся: метод Дейса [10], метод Левенталья [110] и фотоколориметрический метод [196].

Анализ литературных данных показал, что наиболее чувствительным, специфичным и простым методом является фотоколориметрический метод с использованием реактива Фолина-Чикольте.

Оптимизация состава реакционной смеси. При проведении окислительно-восстановительной реакции, подбирали объемы реагентов так, чтобы объем реакционной смеси не превышал 1,5 мл, и оптическая плотность находилась в интервале измерения прибора. При этом в качестве стандарта использовали спиртовой раствор галловой кислоты в концентрации 10 мкг/мл (опыт 1) и 100 мкг/мл (опыт 2). Результаты измерения оптической плотности приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание фенольных соединений

Код р.с.	Объем пробы, мкл	Объем ВД, мкл	Объем ФЧ, мкл	Объем КН, мкл	Объем р.с., мкл	Опыт 1		Опыт 2	
						Конц-я ГК в р.с., мкг/мл	D ₇₆₅ , о.е.	Конц-я ГК в р.с., мкг/мл	D ₇₆₅ , о.е.
a)	25	775	50	150	1000	0,25	0,040	2,5	0,244
b)	50	750	50	150	1000	0,50	0,042	5,0	0,493
c)	100	450	50	400	1000	1,00	0,144	10,0	1,644
d)	200	450	100	400	1150	1,74	0,249	17,4	2,522
e)	400	250	100	400	1150	3,48	0,306	34,8	4,000*

Примечания: р.с. – реакционная смесь; конц-я – концентрация; ВД – вода дистиллированная; ФЧ – реактив Фолина-Чикольте; КН – 7,5% раствор карбоната натрия; ГК – галловая кислота, * верхний предел чувствительности спектрофотометра.

В таблице 16 показаны максимальные значения оптической плотности у реакционных смесей «*d*» и «*e*». С учетом соответствия повышения оптической плотности увеличению концентрации галловой кислоты реакционная смесь «*d*» является оптимальной для обеспечения чувствительности анализа и стабильности результатов.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси «*d*»: в микропробирку на 1,5 мл вносят 200 мкл пробы, 450 мкл воды дистиллированной,

100 мкл реактива Фолина-Чикольте и перемешивают; через 3-5 минут к смеси добавляют 400 мкл 7,5-ного % раствора натрия карбоната; смесь выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 60-80 минут, в случае выпадения осадка центрифугируют при 5-6 тыс. об./мин в течение 10-15 минут; в раствор сравнения вместо пробы вносят воду дистиллированную; измеряют оптическую плотность при длине волны 765 нм.

Для построения калибровочного графика стандартный раствор кислоты галловой (5 мг/мл) разбавляли 96% этиловым спиртом, получая рабочие растворы с содержанием 9; 12,5; 15,6; 18,8; 25; 31,25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100; 125; мкг/мл. Экспериментальные данные по построению калибровочного графика представлены на рисунке 17.

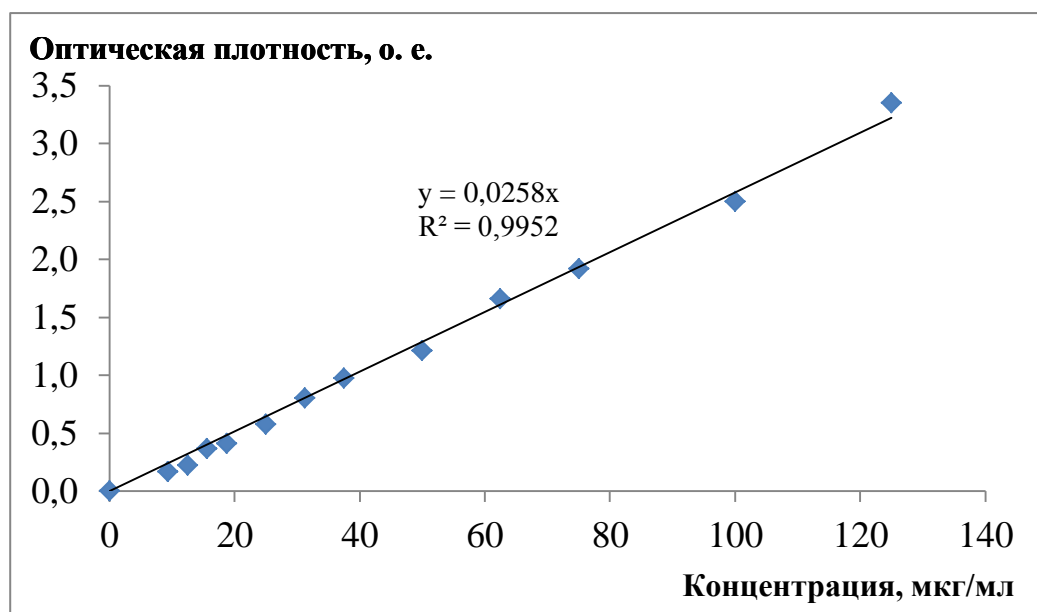


Рисунок 17 – Калибровочный график по галловой кислоте

Показано, что в интервале концентраций галловой кислоты от 9 мкг/мл до 125 мкг/мл зависимость оптической плотности линейна и проходит через ноль осей ординат.

По разработанной методике анализа содержания фенольных соединений в сухих препаратах из высших грибов в ГНЦ ВБ ВЕКТОР утверждена СОП № 3-040/01-16 «Определение концентрации фенольных соединений в препаратах, выделенных из природных источников» (Приложение 1).

3.3.2.4 Разработка методики количественного анализа на содержание флавоноидов

Разработка методики количественного анализа флавоноидов в природных объектах включала следующие этапы: выбор метода анализа, выбор реактивов, оптимизация концентрации компонентов, выбор длины волны.

Выбор метода. Спектральные методы анализа (фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, денситометрия) имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с гравиметрическими и титрометрическими методами, а именно: сокращение времени анализа, высокая чувствительность и специфичность [57]. Для настоящей работы выбран фотоколориметрический метод, основанный на реакции комплексообразования с солями металлов, проявляющей высокую специфичность в отношении флавоноидов.

Выбор реагентов. Наиболее распространенным и доступным комплексообразователем для количественного анализа флавоноидов является соль алюминия [64; 65], поэтому в качестве основного реактива для анализа флавоноидов выбран хлорид алюминия.

В связи с тем, что полученный комплекс флавоноидов с солями неустойчив, требуется создать условия его стабилизации. В литературе описано много способов определения содержания флавоноидов в растительном сырье с помощью реакции комплексообразования с алюминия хлоридом с добавлением соляной или уксусной кислот [64]. Однако в работе [65] показано, что кислоты не оказывают заметного стабилизирующего действия на образующийся комплекс.

В работе Петриченко В.М. установлено, что перспективным стабилизирующим реактивом, повышающим чувствительность анализа, является ацетат натрия. Например, одновременное использование комплексообразователя и стабилизатора при анализе флавоноидов очанки увеличивало батохромное смещение полос поглощения по сравнению с использованием только комплексообразующего реагента [104].

Следовательно, для усиления батохромного смещения и повышения чувствительности методики необходимо введение ацетата натрия в качестве стабилизирующего реагента.

Подбор концентрации реактивов. В работах [64; 65; 104] алюминия хлорид применяют в концентрациях от 2 до 5%, а ацетат натрия – в концентрации 8%. Оба реактива растворены в 96% этаноле. Выбраны минимально возможные концентрации реагентов: 2% для алюминия хлорида и 4% для ацетата натрия. Это связано с тем, что при высоких концентрациях реагентов и незначительных изменениях внешних условий в реакционной смеси существует риск возникновения опалесценции и даже выпадения осадка.

Оптимизация соотношения реактивов. В большинстве случаев для биохимического анализа используют сравнительно большие объемы (примерно 2-10 мл) проб и реактивов, что вполне оправдано целью снижения ошибки измерения и небольшой серией анализируемых проб (до 5). В настоящей работе объемы реагентов подбирали так, чтобы объем реакционной смеси был равен 1,0 мл. При этом серия анализируемых проб составляла 20 и более.

Результаты измерения оптической плотности реакционных смесей *a, b, c, d, e, f*, где в качестве пробы использовали дигидрокверцетин в концентрации 50 мкг/мл (опыт 1) и 500 мкг/мл (опыт 2), при длинах волн 360 нм, 370 нм и 380 нм, приведены в таблице 17. При этом в качестве отрицательного контроля готовили соответствующую реакционную смесь, в которую вместо раствора хлорида алюминия вносили 96% спирт.

Таблица 17 – Оптическая плотность различных составов реакционной смеси для трех длин волн при анализе на содержание флавоноидов

Код р.с.	Соотношение П : ХА : СП : АН	Опыт 1				Опыт 2			
		Конц-я ДКВ в р.с., мкг/мл	D ³⁶⁰ , о.е.	D ³⁷⁰ , о.е.	D ³⁸⁰ , о.е.	Конц-я ДКВ в р.с., мкг/мл	D ³⁶⁰ , о.е.	D ³⁷⁰ , о.е.	D ³⁸⁰ , о.е.
a)	2:2:5:1	10	0,037	0,081	0,085	100	0,521	0,871	1,014
b)	2:1:6:1	10	0,035	0,076	0,074	100	0,548	0,818	0,888
c)	4:2:13:1	10	0,027	0,088	0,100	100	0,461	0,799	0,931
d)	1:1:7:1	5	-0,010	0,011	0,010	50	0,304	0,448	0,489
e)	2:2:15:1	5	-0,012	0,021	0,024	50	0,211	0,399	0,472
f)	2:1:16:1	5	-0,005	0,024	0,017	50	0,249	0,413	0,465

Примечания: р.с. – реакционная смесь; конц-я – концентрация; П – проба; ХА – 2% спиртовый раствор хлорида алюминия; СП – спирт этиловый 96%; АН – 4% спиртовый раствор ацетата натрия; ДКВ – дигидрокверцетин.

При измерении оптической плотности различных реакционных смесей, выявлено, что наименьшее значение оптической плотности при трех длинах волн наблюдается у реакционных смесей «*d*», «*e*», и «*f*», а наибольшее – у реакционных смесей «*a*», «*b*» и «*c*». С учетом соответствия повышения оптической плотности увеличению концентрации дигидрокверцетина реакционная смесь «*c*» является оптимальной для обеспечения стабильности результатов анализа и чувствительности анализа.

Выбор длины волны. Один из максимумов поглощения дигидрокверцетина в дифференциальном спектре находится в диапазоне 350-400 нм, рутина и лютеолин-7 гликозида – в диапазоне 390-430 нм. С учетом сказанного и результатов исследований других авторов выбраны следующие длины волн для анализа флавоноидов: 380 нм для дигидрокверцетина, 410 и 420 нм для рутина и лютеолин-7 гликозида соответственно.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси «*c*»: в микропробирку на 1,5 мл вносят 200 мкл пробы, прибавляют 100 мкл 2 % раствора хлорида алюминия; смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 40-60 минут; по истечении времени инкубации к смеси прибавляют 650

мкл 96 %-ного этилового спирта и 50 мкл 4 %-ного спиртового раствора натрия ацетата; параллельно готовят раствор сравнения: в микропробирку на 1,5 мкл вносят 200 мкл пробы, прибавляют 800 мкл 96 %-ного этанола; измеряют оптическую плотность при длинах волн 380, 410 и 420 нм.

Для построения калибровочного графика стандартный раствор дигидрокверцетина (1 мг/мл) разбавляли 96% этиловым спиртом, получая рабочие растворы с содержанием 25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100; 125; 150; 200; 250; 300; 400; 500; 600 мкг/мл. Экспериментальные данные по построению калибровочного графика представлены на рисунке 18.

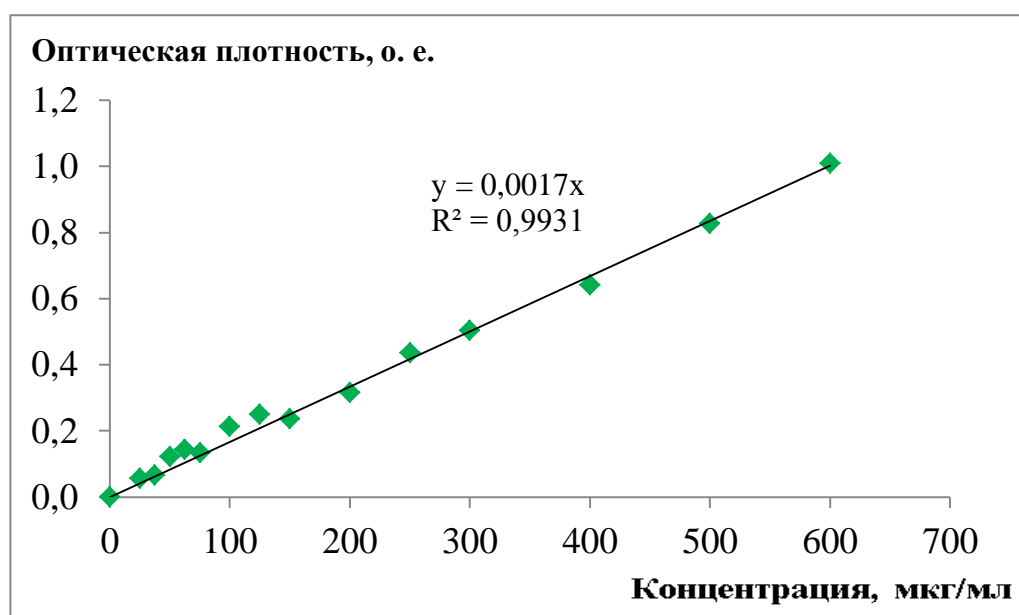


Рисунок 18 – Калибровочный график по дигидрокверцетину

Показано, что в интервале концентраций дигидрокверцетина от 25 мкг/мл до 600 мкг/мл зависимость оптической плотности имеет линейный характер. Следует отметить положительный момент широкого диапазона количественного анализа флавоноидов, т.к. упрощается стадия пробоподготовки путем снижения количества и кратности разведений анализируемого образца.

По разработанной методике анализа содержания флавоноидов в сухих препаратах из высших грибов в ГНЦ ВБ ВЕКТОР утверждена СОП № 3-032/01-13 «Определение концентрации флавоноидов методом комплексообразования с хлоридом алюминия» (Приложение 1).

Заключение к п. 3.3

Разработана методика качественного анализа флавоноидов, тритерпенов и каротиноидов в препаратах высших базидиомицетов на основе ТСХ. Для анализа тритерпенов и каротиноидов выбрана система растворителей бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4), а для анализа флавоноидов выбрана система растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3).

Разработаны и апробированы экспресс-методики количественного определения суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из базидиальных грибов. Достоинствами методик являются простота, высокая скорость определения, использование общелабораторного оборудования, малые объемы исследуемых проб и реактивов. Предложенные методики позволяют проводить серийные анализы для нескольких десятков образцов. Установлено, что уменьшение объема исследуемой пробы в 5-10 раз не снижает чувствительность разработанных авторами методик относительно классических вариантов данных методик. Разработанные методики анализа содержания суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов могут быть рекомендованы для характеристики грибов и растений как природного, так и биотехнологического происхождения.

3.4 Физико-химические характеристики экспериментальных образцов грибных препаратов

3.4.1 Физико-химические свойства экспериментальных образцов грибных препаратов *Daedaleopsis tricolor*

Согласно литературным данным в плодовых телах *Daedaleopsis tricolor* найдены полисахариды [179] и ланостановые тритерпены, например 20(29)-люпен-3-он [153]. Также известно, что выращенный глубинным способом мицелий *Daedaleopsis tricolor* содержит сесквитерпены и эгстеролы [228].

Используя разработанную автором технологию выделения комплекса БАВ, получены этанольные и водные экстракты из плодовых тел и биомассы культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*, составляющие основу экспериментальных образцов препаратов широкого спектра действия.

Физические и органолептические свойства экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 – Физические и органолептические свойства экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел гриба *Daedaleopsis tricolor*

Препарат	Место и время сбора, субстрат	Растворимость в воде	Потеря в массе при высушивании, %	Зольность, %
Е	с. Вьюны; август 2013; береза	Малорастворим	4,5	5,4
	п. Кольцово; сентябрь 2013; береза	Малорастворим	4,6	5,2
	п. Кольцово; сентябрь 2013; ива	Малорастворим	4,3	7,1
W	с. Вьюны; август 2013; береза	Умеренно растворим	4,3	8,0
	п. Кольцово; сентябрь 2013; береза	Умеренно растворим	4,2	8,4
	п. Кольцово; сентябрь 2013; ива	Умеренно растворим	4,5	8,7

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт.

Сухие экстракты плодового тела *Daedaleopsis tricolor* представляли собой аморфные порошки коричневого цвета, горьковатого вкуса, специфического запаха, умеренно растворимые в воде дистиллированной. Зольность этанольного экстракта из плодового тела гриба с ивы достоверно выше, чем зольность этанольного экстракта из плодового тела с березы (таблица 18).

Таблица 19 – Физические и органолептические свойства экспериментальных образцов препаратов из мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor*


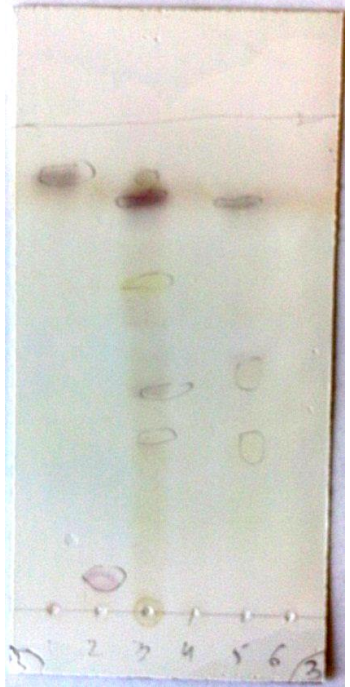
Препарат	Штамм	Внешний вид	Растворимость в воде	Потеря в массе при высушивании, %	Зольность, %
Е	Db-14	Порошок светло коричневого цвета	Умеренно растворим	4,9	7,1
	Db-18	Порошок светло коричневого цвета	Умеренно растворим	5,1	7,6
	Dr-17	Порошок коричневого цвета	Умеренно растворим	4,7	9,6
W	Db-14	Порошок песочного цвета	Умеренно растворим	4,6	9,3
	Db-18	Порошок коричневого цвета	Умеренно растворим	4,9	9,9
	Dr-17	Порошок темно коричневого цвета	Умеренно растворим	4,8	10,3

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт.

Экспериментальные образцы препаратов на основе этанольных экстрактов, полученные из культивируемого мицелия, представляли собой порошки преимущественно светло-коричневого цвета, горьковатого вкуса, специфического запаха. Экспериментальные образцы препаратов на основе водных экстрактов, полученные из культивируемого мицелия, представляли собой порошки песочного, светло-коричневого, темно-коричневого цвета, горьковатого вкуса, специфического запаха. Образцы препаратов из культивируемого мицелия отличались лучшей растворимостью в воде дистиллированной по сравнению с образцами из плодовых тел гриба (таблицы 18 и 19).

Биохимический состав препаратов из плодовых тел и биомассы культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* определяли методом ТСХ. Результаты анализа препаратов *D. tricolor* представлены в таблицах 20, 21 и 22.

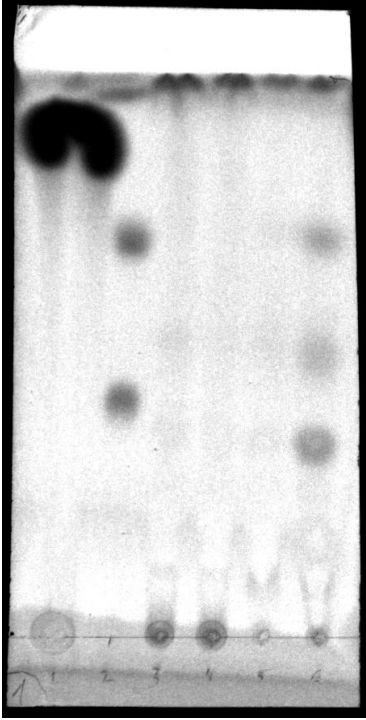
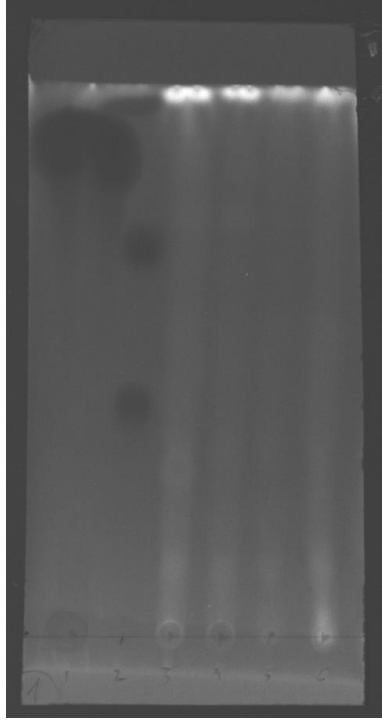
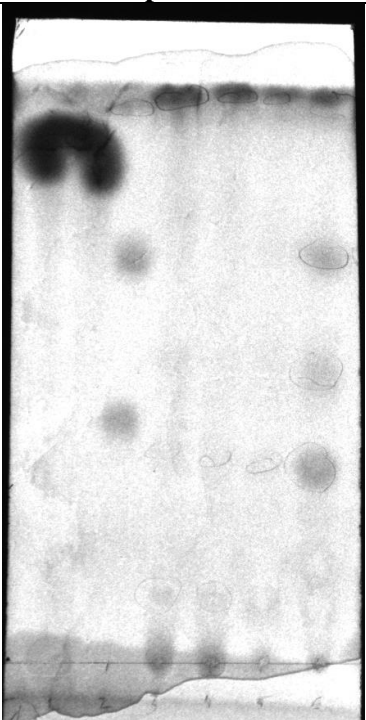
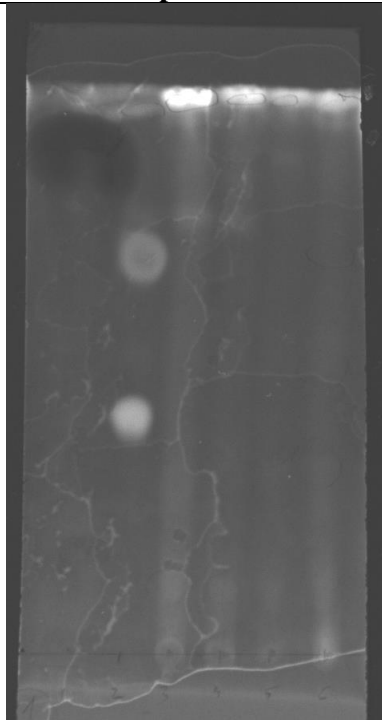
Таблица 20 – Анализ экспериментальных образцов препаратов гриба *Daedaleopsis tricolor* методом ТСХ на каротиноиды и тритерпены в системе растворителей бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4)

№	Образцы	Rf фактор	До обработки 20% раствором фосфорно- вольфрамовой кислоты	После обработки 20% раствором фосфорно- вольфрамовой кислоты
1	β-каротин	0,84		
2	Лекарственный препарат «Глицирам»	0,87		
3	Препарат Е из плодового тела (п. Кольцово, береза)	0,36		
		0,44		
		0,67		
		0,83		
4	Препарат W из плодового тела (п. Кольцово, береза)	-		
5	Препарат Е из мицелия (Db-18)	0,35		
		0,49		
		0,84		
6	Препарат W из мицелия (Db-18)	-		

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт.

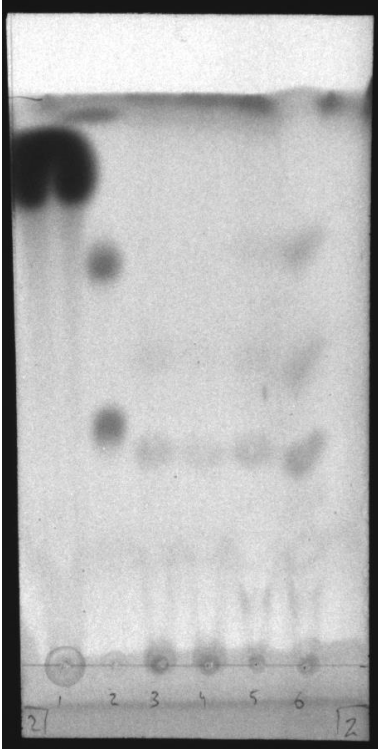


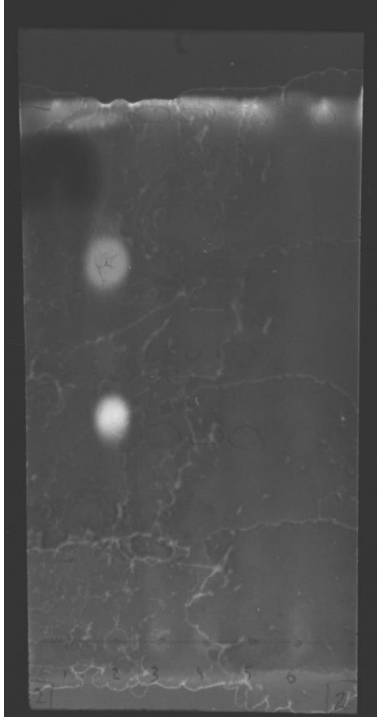
Каротиноиды и тритерпены обнаружены с помощью ТСХ в системе растворителей бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол (10:4:4) в этанольных экстрактах, как из плодовых тел гриба, так и из биомассы мицелия, в то время как в водных экстрактах *Daedaleopsis tricolor* эти группы БАВ обнаружены не были (таблица 18). Учитывая разные величины Rf фактора стандарта тритерпенов, представленного препаратом «Глицирам», и экстрактов притом, что и те и другие проявляются фосфорновольфрамовой кислотой установлено, что тритерпены в экстрактах гриба *D. tricolor* по структуре отличаются от тритерпенов препарата «Глицирам» – производных олеаноловой кислоты. Согласно литературным данным, *D. tricolor* содержит тритерпены ланостанового ряда [153].

Таблица 21 – Анализ экспериментальных образцов препаратов на основе этанольных экстрактов гриба *Daedaleopsis tricolor* методом ТСХ на флавоноиды

№	Образцы	Rf фактор	UV (254 нм) до обработки $AlCl_3$	UV (365 нм) до обработки $AlCl_3$
1	Галловая кислота	0,89		
2	Смесь флавоноидов (ДКВ, рутин, лютеолин-7- гликозид)	0,43 0,71 0,97		
3	Препарат Е из плодового тела (субстрат: береза)	0,10 0,34 0,50 0,75 0,96		
4	Препарат Е из плодового тела (субстрат: ива)	0,11 0,35 0,73 0,95		
5	Препарат Е из мицелия (штамм Db-18)	0,08 0,32 0,78 0,88 0,97		
6	Препарат Е из мицелия (штамм Dг-17)	0,10 0,34 0,50 0,60 0,98	UV (254 нм) после обработки $AlCl_3$	UV (365 нм) после обработки $AlCl_3$
				

Примечание: Е – этанольный экстракт.

Таблица 22 – Анализ экспериментальных образцов препаратов на основе водных экстрактов гриба *Daedaleopsis tricolor* методом ТСХ на флавоноиды

№	Образцы	Rf фактор	UV (254 нм) до обработки $AlCl_3$	UV (365 нм) до обработки $AlCl_3$
1	Галловая кислота	0,89		
2	Смесь флавоноидов (ДКВ, рутин, лютеолин-7-гликозид)	0,41 0,70 0,97		
3	Препарат W из плодового тела (субстрат: береза)	0,39 0,56 0,98		
4	Препарат W из плодового тела (субстрат: ива)	0,38 0,54 0,99		
5	Препарат W из мицелия (штамм Db-18)	0,37 0,54 0,73 0,99		
6	Препарат W из мицелия (штамм Dr-17)	0,38 0,53 0,74 0,99	UV (254 нм) после обработки $AlCl_3$	UV (365 нм) после обработки $AlCl_3$
				

Примечание: **W** – водный экстракт.

В результате анализа флавоноидов методом ТСХ в системе растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3) установлено, что практически все препараты из гриба *Daedaleopsis tricolor* содержат флавоноиды: рутин, лютеолин-7-гликозид, дигидрокверцетин или их производные (таблицы 21 и 22). Для анализа использовали разработанную модельную систему – смесь флавоноидов (рутин, лютеолин-7-гликозид, дигидрокверцетин), разработанную для системы растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3).

Результаты качественного анализа препаратов из плодового тела и культивируемого мицелия *D. tricolor* показаны в итоговой таблице 23.

Таблица 23 – Качественный состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и мицелия *Daedaleopsis tricolor*

Вид сырья	Препарат	Б	ПС	ФС	ФЛ	КАР	ТРИТ
Плодовые тела	Е	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	–	–
Мицелий	Е	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	–	–

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; **Б** – белки; **ПС** – полисахариды; **КАР** – каротиноиды; **ФС** – фенольные соединения; **ФЛ** – флавоноиды; **ТРИТ** – тритерпены.

Таким образом, в состав препаратов *D. tricolor* входят полисахариды, белки, фенольные соединения, флавоноиды, каротиноиды и тритерпены. На следующем этапе проводился количественный анализ БАВ, входящих в состав полученных грибных препаратов.

Анализ препаратов *D. tricolor* на количественное содержание полисахаридов, белков, фенольных соединений, флавоноидов и каротиноидов проводили, используя комплекс физико-химических методов. В таблице 24 приведен биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел *D. tricolor*.

Таблица 24 – Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела *Daedaleopsis tricolor*

Препарат	Место сбора	Субстрат	Выход ЭВ, % (M±m) (n=4)	C _Б , мг/г (M±m) (n=4)	C _{ЛС} , мг/г (M±m) (n=4)	C _{КАР} , мкг/г (M±m) (n=4)	C _{ФС} , мг/г (M±m) (n=4)	C _{ФЛ} , мг/г (M±m) (n=4)
Е	Село Вьюны	Береза	5,0±0,1 [@]	17±1 [@]	331±8 [@]	33±2	9,2±0,8 [@]	11±1 [@]
	п. Кольцово	Береза	7,7±0,3 [@]	11±1	217±48	39±3	6,2±0,2 [@]	10±1 [@]
	п. Кольцово	Ива	9,5±0,4 [@]	9±1 [@]	268±7	25±2	7,3±0,6 [@]	13±2 [@]
W	Село Вьюны	Береза	8,8±0,3	11±2	393±16	–	4,9±0,3	≤5
	п. Кольцово	Береза	10,6±0,2	10±1	307±49	–	4,6±0,3	≤5
	п. Кольцово	Ива	14,3±0,3	7±1	300±12	–	4,6±0,2	≤5

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; ЭВ – экстрактивные вещества; C_Б – содержание белка; C_{ЛС} – содержание полисахаридов; C_{КАР} – содержание каротиноидов; C_{ФС} – содержание фенольных соединений; C_{ФЛ} – содержание флавоноидов; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; [@] – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при p≤0,05.

Как видно из таблицы 24, выход веществ, экстрагируемых водой дистиллированной, достоверно выше, чем выход веществ, экстрагируемых 70% этанолом.

Содержание полисахаридов в этанольном экстракте из плодовых тел, собранных в окрестностях села Вьюны, достоверно выше, чем в соответствующем водном экстракте.

Следует отметить, что содержание флавоноидов и фенольных соединений в этанольных экстрактах достоверно выше, чем в соответствующих водных экстрактах. Выявлено, что содержание белка в водном экстракте из плодовых тел, собранных в окрестностях села Вьюны с березы и поселка Кольцово с ивы, достоверно выше, чем в соответствующем этанольном экстракте.

В таблице 25 приведен биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого глубинным способом мицелия *D. tricolor*.

Таблица 25 – Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* (глубинное культивирование)

Препарат	Штамм	Питательная среда	Выход ЭВ, % ($M \pm m$)(n=4)	C_B , мг/г ($M \pm m$)(n=4)	$C_{ПС}$, мг/г ($M \pm m$)(n=4)	$C_{КАР}$, мкг/г ($M \pm m$)(n=4)	$C_{ФС}$, мг/г ($M \pm m$)(n=4)	$C_{ФЛ}$, мг/г ($M \pm m$)(n=4)
Е	Db-14	ГПС	27±2	≤5	153±16	45±2	2,4±0,1	10±3
	Db-18		24±2 [@]	≤5 [@]	70±19	36±4	2,6±0,3	7±1
	Dr-17		25±2	≤5	37±4 [@]	29±3	3,6±0,3	≤5
	Db-14	ККЭ	22±2	≤5 [@]	162±7 [@]	34±3	7,4±0,4 [@]	≤5
	Db-18		18±1	≤5 [@]	161±16 [@]	5±2	1,9±0,2 [@]	≤5
	Dr-17		17±1 [@]	≤5 [@]	158±14 [@]	17±2	≤1,8 [@]	≤5
	Db-14	ГС	52±4 [@]	≤5	471±20 [@]	11±3	≤1,8	≤5
	Db-18		19±1	12±1	142±38	4±2	4,0±0,1 [@]	≤5
	Dr-17		50±3	≤5	335±24	4±1	≤1,8	≤5
W	Db-14	ГПС	23±3	≤5	150±15	–	2,3±0,1	≤5
	Db-18		36±2	10±1	104±27	–	1,9±0,1	≤5
	Dr-17		27±2	≤5	86±9	–	3,2±0,4	≤5
	Db-14	ККЭ	28±2	15±1	257±22	–	1,9±0,1	≤5
	Db-18		18±1	17±1	77±21	–	5,2±0,3	≤5
	Dr-17		22±2	19±1	80±9	–	4,6±0,1	≤5
	Db-14	ГС	38±2	≤5	263±10	–	≤1,8	≤5
	Db-18		20±2	11±1	214±26	–	3,0±0,3	≤5
	Dr-17		52±2	≤5	300±22	–	≤1,8	≤5

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; ЭВ – экстрактивные вещества; C_B – содержание белка; $C_{ПС}$ – содержание полисахаридов; $C_{КАР}$ – содержание каротиноидов; $C_{ФС}$ – содержание фенольных соединений; $C_{ФЛ}$ – содержание флавоноидов; ГПС – глюкозопептонная среда; ККЭ – среда с крахмалом и кукурузным экстрактом; ГС – среда с глюкозой и соевой мукой; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; [@] – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

На основании данных, представленных в таблице 25 показано, что выход веществ, экстрагируемых водой дистиллированной, из мицелия *Daedaleopsis tricolor* Db-14, выращенного на ГС достоверно выше, чем выход веществ, экстрагируемых 70% этанолом из того же мицелия. Содержание белка в водных экстрактах мицелия, выращенного в ККЭ (штаммы Db-14, Db-18 и Dr-17) и ГПС (штамм Db-18) достоверно выше, чем в этанольных экстрактах мицелия. Выявлено, что содержание полисахаридов в этанольных экстрактах мицелия *D. tricolor*, выращенного в ККЭ (штамм Dr-17) и в ГС (штамм Db-14), достоверно выше, чем в соответствующих водных экстрактах. Наряду с этим, содержание полисахаридов в этанольных экстрактах из мицелия, выращенного в ГПС (штамм

Dr-17) и в ККЭ (штаммы Db-14 и Db-18), достоверно ниже, чем в соответствующих водных экстрактах. Следует отметить, что содержание фенольных соединений в водных экстрактах из мицелия, выращенного в ККЭ (штаммы Db-18 и Dr-17), достоверно выше, чем в соответствующих этанольных экстрактах. При этом содержание фенольных соединений в водных экстрактах из мицелия, выращенного в ККЭ (штамм Db-14) и ГС (штамм Db-18), достоверно ниже, чем в соответствующих этанольных экстрактах.

В таблице 26 приведен биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия *D. tricolor*, выращенного поверхностным способом.

Таблица 26 – Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* (поверхностное культивирование)

Препарат	Штамм	Питательная среда	Выход ЭВ, % (M±m)(n=4)	C _Б , мг/г (M±m)(n=4)	C _{ПС} , мг/г (M±m)(n=4)	C _{КАР} , мкг/г (M±m)(n=4)	C _{ФС} , мг/г (M±m)(n=4)	C _{ФЛ} , мг/г (M±m)(n=4)
Е	Db-14	ГПС	27±2	≤5 [@]	46±1	20±2	≤1,8 [@]	≤5
	Db-18		31±1 [@]	≤5	42±5	19±1	2,8±0,2 [@]	≤5
	Dr-17		23±1 [@]	≤5 [@]	37±1 [@]	12±1	2,6±0,1	≤5
	Db-14	ККЭ	27±1 [@]	≤5 [@]	281±13	30±2	≤1,8	≤5
	Db-18		21±1	≤5 [@]	114±33	11±1	≤1,8 [@]	≤5
	Dr-17		20±1	14±1 [@]	100±19	39±2	≤1,8 [@]	≤5
	Db-14	ГС	14±1	21±1	109±7	45±2	≤1,8 [@]	≤5
	Db-18		16±1	≤5 [@]	118±15	7±1	2,0±0,1	≤5
	Dr-17		15±1 [@]	9±1 [@]	369±24	10±1	2,3±0,2 [@]	≤5
W	Db-14	ГПС	31±2	7±1	59±3	–	4,4±0,3	≤5
	Db-18		36±1	≤5	52±5	–	3,6±0,2	≤5
	Dr-17		32±1	7±1	71±3	–	2,4±0,2	≤5
	Db-14	ККЭ	24±1	10±1	252±13	–	≤1,8	≤5
	Db-18		22±2	11±1	81±18	–	4,6±0,3	≤5
	Dr-17		17±1	25±2	42±14	–	5,3±0,5	≤5
	Db-14	ГС	16±1	21±2	84±7	–	2,8±0,1	≤5
	Db-18		17±1	11±1	77±9	–	2,0±0,1	≤5
	Dr-17		20±1	15±1	261±39	–	≤1,8	≤5

Примечания: Е – этанольный экстракт; W – водный экстракт; ЭВ – экстрактивные вещества; C_Б – содержание белка; C_{ПС} – содержание полисахаридов; C_{КАР} – содержание каротиноидов; C_{ФС} – содержание фенольных соединений; C_{ФЛ} – содержание флавоноидов; ГПС – глюкозопептонная среда; ККЭ – среда с крахмалом и кукурузным экстрактом; ГС – среда с глюкозой и соевой мукой; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; [@] – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при p≤0,05.

Как видно из таблицы 26, выход веществ, экстрагируемых водой дистиллированной, из мицелия *Daedaleopsis tricolor*, выращенного на ГПС и ГС достоверно выше, чем выход веществ, экстрагируемых 70% этанолом. Содержание белка почти во всех водных экстрактах мицелия, достоверно выше, чем в этанольных экстрактах мицелия (кроме экстрактов мицелия *D. tricolor*, выращенного в ГПС на основе штамма Db-18 и мицелия, выращенного в ГС на основе штамма Db-14).

Выявлено, что содержание фенольных соединений в водных экстрактах из мицелия, выращенного в ГПС (штаммы Db-14 и Db-18), ККЭ (штаммы Db-18 и Dr-17) и в ГС (штамм Db-14), достоверно выше, чем в соответствующих этанольных экстрактах.

Учитывая результаты, представленные в таблицах 24, 25 и 26, показано, что выход экстрактивных веществ из мицелия достоверно выше, чем из плодового тела. Это согласуется с литературными данными о ксилотрофных грибах. В работе Ковалевой [49] показано, что выход экстрактивных веществ из мицелия грибов, как правило, превышал выход экстрактивных веществ из плодовых тел грибов в 6,1-11,4 раз для гриба *Fomitopsis officinalis*, в 1,7-1,8 раз для гриба *Ganoderma applanatum* и в 1,0-1,7 раз для *Trametes versicolor*.

Отмечено, что суммарное содержание полисахаридов в экстрактах из плодового тела гриба достоверно выше, чем в экстрактах из мицелия, выращенного в ГПС. При этом 75% экстрактов, полученных из мицелия, выращенного на средах, содержащих, крахмал и кукурузный экстракт или глюкозу и соевую муку, наравне с экстрактами из плодовых тел показывали высокое содержание полисахаридов.

Выявлено, что содержание фенольных соединений в этанольных экстрактах из плодового тела *Daedaleopsis tricolor* достоверно выше, чем в этанольных экстрактах из культивируемого мицелия. При этом содержание фенольных соединений в этанольном экстракте, полученном из мицелия *D. tricolor* Db-14, выращенного глубинным способом в ККЭ, сопоставимо с содержанием фенольных соединений в этанольных экстрактах из плодовых тел.

На основании данных таблиц 24, 25 и 26 рассчитано содержание суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в пересчете на сухое сырье природного и биотехнологического происхождения с учетом выхода экстрактивных веществ.

Показано, что содержание полисахаридов в пересчете на сухую биомассу культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*, выращенного глубинным способом в ККЭ (штамм Db-14) и в ГС (штаммы Db-14 и Dr-17) и поверхностным способом в ККЭ (штамм Db-14) и в ГС (штамм Dr-17), достоверно превышает содержание полисахаридов в сухих плодовых телах гриба. Следует отметить, что содержание полисахаридов в мицелии *Daedaleopsis tricolor* Db-14, выращенном глубинным способом в ГС, превышало содержание полисахаридов в плодовых телах гриба в 5,5-7,7 раз.

Содержание суммарного белка в пересчете на сухой мицелий, выращенный глубинным способом в ГС (штамм Db-18) и поверхностным способом в ККЭ (штамм Dr-17) и ГС (штаммы Db-14, Db-18 и Dr-17), достоверно выше содержания белка в плодовых телах *D. tricolor*.

Отмечено, что содержание фенольных соединений в сухом мицелии *Daedaleopsis tricolor*, выращенном глубинным способом культивирования в ККЭ (штамм Db-14) и поверхностным способом в ГПС (штаммы Db-14 и Db-18), достоверно выше, чем содержание фенольных соединений в плодовых телах.

Выявлено, что содержание флавоноидов в сухой биомассе мицелия, выращенного глубинным способом в ГПС (штаммы Db-14 и Db-18), достоверно превышает содержание флавоноидов в сухих плодовых телах гриба.

Учитывая результаты проведенных исследований, сделан вывод, о том, что содержание суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в мицелии *Daedaleopsis tricolor* при выбранных условиях культивирования достоверно выше, чем в плодовых телах. Следует отметить, что штаммы *Daedaleopsis tricolor* Db-14 и Dr-17 являются перспективными продуцентами полисахаридов.

3.4.2 Физико-химические свойства экспериментальных образцов препаратов *Fomes fomentarius*

Экспериментальные образцы препаратов на основе экстрактов из плодовых тел и культивируемого мицелия *Fomes fomentarius*, охарактеризованы по физическим свойствам и биохимическому составу. Экспериментальный образец препарата на основе этанольного экстракта из плодовых тел *F. fomentarius* представляет собой аморфный мелкодисперсный порошок коричневого цвета со специфическим запахом и содержанием влаги 4,6 %, гигроскопичен, малорастворим в воде. Показано, что полисахариды и белки присутствуют во всех образцах. Каротиноиды и тритерпены обнаружены во всех препаратах на основе этанольного экстракта *F. fomentarius*. Фенольные соединения обнаружены во всех препаратах, как на основе этанольного, так и водного экстрактов. Результаты анализа биохимического состава экспериментальных образцов препаратов *F. fomentarius* представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и культивируемого мицелия *Fomes fomentarius*

Препарат	Вид сырья	Выход ЭВ, % ($M \pm m$) (n=4)	C_B , мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ПС}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{КАР}$, мкг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ФС}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)	$C_{ФЛ}$, мг/г ($M \pm m$) (n=4)
Е	Плодовое тело (2011 г.)	5,7±0,1*	9±1 [@]	123±4 [@]	73±5	66,1±3,4* [@]	304±15* [@]
	Плодовое тело (2012 г.)	7,2±0,1* [@]	12±2 [@]	208±12* [@]	84±9	57,8±4,9* [@]	405±17* [@]
	Мицелий (Кр-112)	41,2±3,8 [@]	12±1 [@]	102±12	65±4	3,3±0,1	≤5* [@]
W	Плодовое тело (2011 г.)	5,6±0,1*	≤5*	280±23*	–	9,5±0,6*	36±4*
	Плодовое тело (2012 г.)	5,8±0,1*	22±2*	664±58*	–	8,1±0,4*	27±3*
	Мицелий (Кр-112)	58,2±1,8	8±1	148±15	–	3,9±0,3	19±1

Примечание: Е – этанольный экстракт; W – водный экстракт; ЭВ – экстрактивные вещества; C_B – содержание белка; $C_{ПС}$ – содержание полисахаридов; $C_{КАР}$ – содержание каротиноидов; $C_{ФС}$ – содержание фенольных соединений; $C_{ФЛ}$ – содержание флавоноидов; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от соответствующего показателя для экстрактов из мицелия по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

На основании данных таблицы 27 выявлено, что выход экстрактивных веществ из биомассы мицелия *Fomes fomentarius* достоверно превышал выход экстрактивных веществ из плодовых тел. Однако при этом содержание полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из плодовых тел *F. fomentarius* достоверно выше, чем в препаратах из культивируемого мицелия.

Содержание фенольных соединений и флавоноидов в препаратах на основе этанольных экстрактов плодового тела *F. fomentarius* достоверно превышало содержание этих групп БАВ в соответствующих препаратах на основе водных экстрактов. При этом содержание полисахаридов в препаратах на основе водных экстрактов из плодового тела достоверно выше, чем в соответствующих препаратах на основе этанольных экстрактов.

С учетом выхода экстрактивных веществ рассчитано содержание суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в пересчете на сухое сырье *Fomes fomentarius*. Отмечено, что содержание суммарного белка и полисахаридов в пересчете на сухой мицелий достоверно выше, чем содержание суммарного белка и полисахаридов в пересчете на плодовое тело *F. fomentarius*. В то же время в плодовых телах гриба наблюдалось более высокое содержание фенольных соединений и флавоноидов, чем в сухой биомассе гриба.

Заключение к п. 3.4

Получены и охарактеризованы по основным группам БАВ препараты на основе экстрактов из плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов Новосибирской области.

Проведено сравнение препаратов на основе экстрактов из плодовых тел и культивируемого мицелия ксилотрофных грибов, по физико-химическим параметрам. Выявлено, что выход экстрактивных веществ из мицелия высших базидиомицетов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* достоверно выше, чем из плодового тела. При этом суммарное содержание групп БАВ, таких как полисахариды, белки и фенольные соединения, в препаратах из плодового тела достоверно выше, чем в препаратах из мицелия. Содержание фенольных соединений в препаратах на основе этанольных экстрактов из плодового тела *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* достоверно выше, чем в препаратах на основе этанольных экстрактов из культивируемого мицелия.

Исследование качественного и количественного анализа экспериментальных образцов препаратов на основе экстрактов из высших базидиомицетов является важным этапом определения критериев стандартизации будущих лекарственных препаратов на основе продуктов биотехнологии.

3.5 Тестирование биологической активности экспериментальных образцов препаратов из базидиомицетов *in vitro*

Тестирование *in vitro* биологической активности высших грибов позволит выявить потенциальные области применения разрабатываемых препаратов на основе базидиомицетов.

Полученные препараты из ксилотрофных базидиомицетов тестировали на антиоксидантную, противоопухолевую и противовирусную активности *in vitro*.

3.5.2 Антиоксидантная активность *in vitro*

Свободные радикалы являются потенциально опасными для живых организмов, т.к. чрезмерная активация свободнорадикальных процессов влечет за собой нежелательные реакции, лежащие в основе целого ряда заболеваний [111]. Поэтому антиоксидантная активность в настоящее время является одной из важнейших характеристик веществ и препаратов.

Известно, что некоторые базидиомицеты, такие как *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus abalones* Han Chen et Chen, *Agrocybe aegerita* обладают антирадикальной активностью, проявляют антиоксидантные свойства при окислении органических субстратов [128; 163; 171].

3.5.2.1 Метод восстановления железа

Восстанавливающую активность экспериментальных образцов препаратов грибов оценивали по методу Oyaizu (метод FRAP) [183]. Способность препаратов грибов восстанавливать железо-феррицианидовый комплекс Берлинской лазури определяли по поглощению на длине волны 695 нм. Увеличение поглощения реакционной смеси при увеличении концентрации сухого вещества в растворе свидетельствует о повышении способности образцов восстанавливать трехвалентное железо ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$).

Железо-восстанавливающая активность приравнивалась к тангенсу угла наклона графика зависимости величины светопоглощения (при 695нм) от концентрации сухого вещества в образце (рисунок 19).

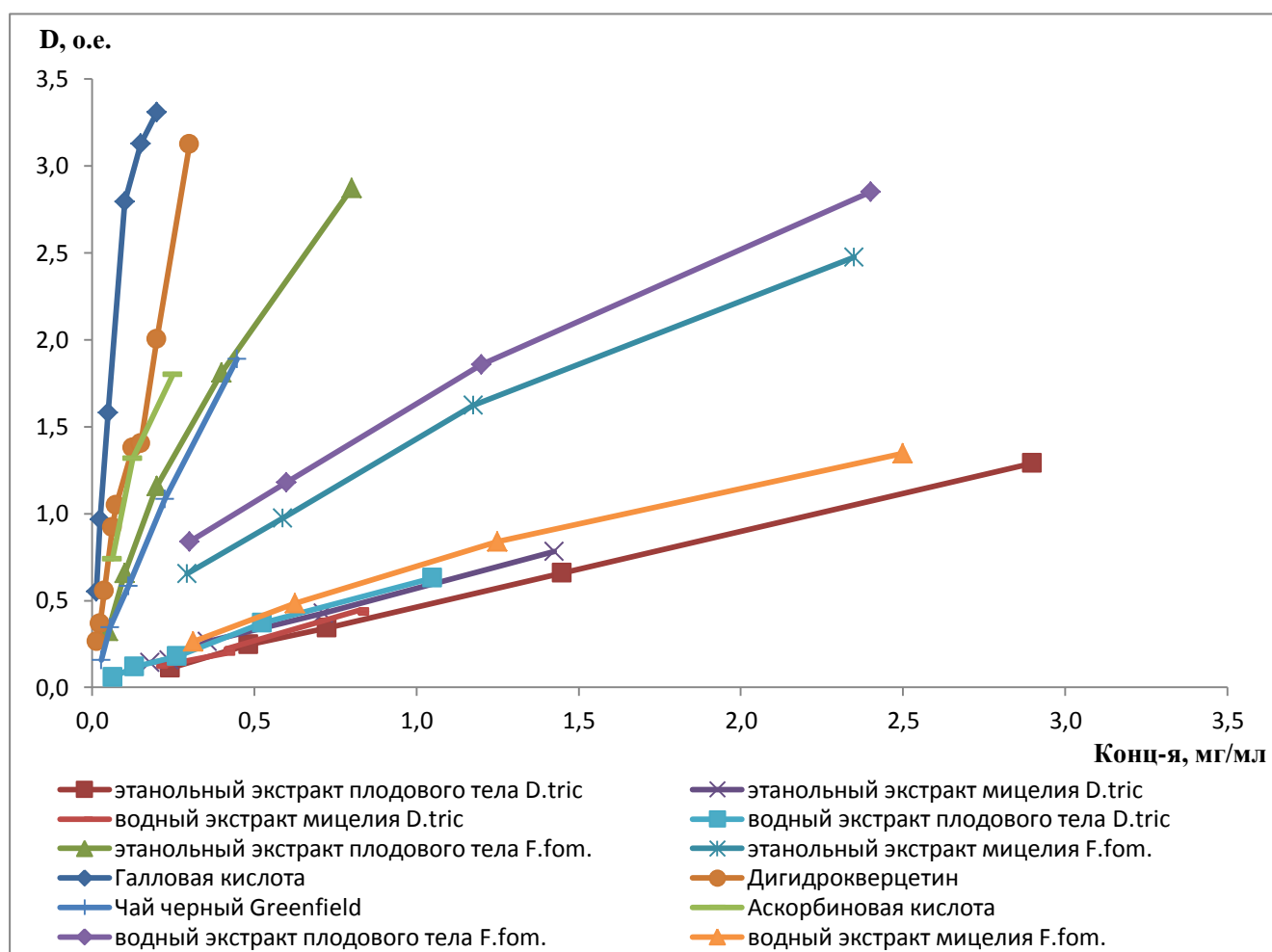


Рисунок 19 – Железо-восстанавливающая способность экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* в сравнении со стандартными образцами

Результаты анализа железо-восстанавливающей способности препаратов на основе этанольных и водных экстрактов грибов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* в сравнении со стандартными образцами представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты анализа железо-восстанавливающей способности экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius*

Препарат	Вид сырья	BC (M±m)(n=3)
Е	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (с. Вьюны; береза)	0,3±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (п. Кольцово; береза)	0,4±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (п. Кольцово; ива)	0,5±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Db-14)	0,6±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Db-18)	0,4±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Dr-17)	0,6±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>F. fomentarius</i> (Караканский бор, береза)	3,8±0,1 [@]
	Мицелий <i>F. fomentarius</i> (штамм Кр-112)	1,1±0,1* [@]
W	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (с. Вьюны; береза)	0,6±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (п. Кольцово; береза)	0,5±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>D. tricolor</i> (п. Кольцово; ива)	0,8±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Db-14)	0,3±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Db-18)	0,8±0,1* [@]
	Мицелий <i>D. tricolor</i> (штамм Dr-17)	0,5±0,1* [@]
	Плодовое тело <i>F. fomentarius</i> (Караканский бор, береза)	1,3±0,1* [@]
	Мицелий <i>F. fomentarius</i> (штамм Кр-112)	1,0±0,1* [@]
Препараты сравнения	Дигидрокверцетин	10,5±0,2
	Кислота галловая	20,1±0,2
	Аскорбиновая кислота	8,1±0,1
	Чай черный Greenfield	4,4±0,1

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; BC – восстанавливающая способность М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; * – отличие от показателя для этанольного экстракта из плодового тела по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от показателя для положительных контролей по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Как видно из таблицы 28, все препараты *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* проявили низкую восстанавливающую способность в сравнении со

стандартными образцами: галловой кислотой, дигидрокверцетином и чаем Greenfield Kenyan Sunrise. Наивысшую железо-восстанавливающую способность среди исследуемых препаратов базидиомицетов достоверно показал этанольный экстракт из плодового тела *F. fomentarius*.

Низкая железо-восстанавливающая способность препаратов *D. tricolor*, возможно, связана с низким содержанием фенольных соединений, т.к. данная группа БАВ оказывает влияние на этот вид активности [121]. Железо-восстанавливающая активность этанольного экстракта плодового тела *F. fomentarius* достоверно превышала активность экстрактов культивируемого мицелия данного гриба, что предположительно обусловлено высоким содержанием в экстракте фенольных соединений и флавоноидов.

3.5.2.2 Антиоксидантная активность в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха

Антиоксидантную активность оценивали по интенсивности торможения накопления продуктов перекисного окисления. Метод основан на фотоколориметрическом определении оптической плотности окрашенного в розовый цвет триметинового комплекса продукта железо-аскорбатиндуцированного окисления твина-80 – малонового диальдегида – с 2-тиобарбитуровой кислотой при длине волны 532 нм. Оценивают интенсивность торможения БАВ исследуемых препаратов накопления продуктов перекисного окисления Твин-80 [105].

Изучение антиоксидантной активности экстрактов ксилотрофных грибов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius* проводили в сравнении со стандартными образцами: галловой кислотой дигидрокверцетином, арбутином, экстрактом чая черного Greenfield Kenyan Sunrise.

Результаты анализа антиоксидантной активности экспериментальных образцов препаратов из *Daedaleopsis tricolor* в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха представлены в таблицах 29 и 30.

Таблица 29 – Результаты анализа антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел *Daedaleopsis tricolor*

Препарат	Место и время сбора, субстрат	Содержание сухого вещества, мг/мл	АОА, % ($M \pm m$)(n=4)
Е	с. Вьюны; август 2013, береза	5	$7 \pm 1^{*@}$
	п. Кольцово; сентябрь 2013, береза	5	$4 \pm 1^@$
	п. Кольцово; сентябрь 2013, ива	5	$1 \pm 1^{*@}$
W	с. Вьюны; август 2013, береза	5	$13 \pm 1^@$
	п. Кольцово; сентябрь 2013, береза	5	$8 \pm 1^@$
	п. Кольцово; сентябрь 2013, ива	5	$11 \pm 1^@$
Препараты сравнения	Дигидрокверцетин	0,5	34 ± 5
	Кислота галловая	5,0	31 ± 5
	Арбутин	5,0	26 ± 3
	Чай черный Greenfield	2,3	36 ± 2

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; АОА – антиоксидантная активность; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; $*$ – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов при $p \leq 0,05$; $^@$ – отличие от показателей для всех положительных контролей по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

На основании данных, представленных в таблице 29, отмечено, что экстракты из плодового тела гриба *Daedaleopsis tricolor* проявляли достоверно более низкую антиоксидантную активность, чем препараты сравнения (дигидрокверцетин, кислота галловая, арбутин, чай черный Greenfield). Отмечено, что водные экстракты показали активность достоверно выше, чем соответствующие этанольные экстракты.

Таблица 30 – Результаты анализа антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*

Препарат	Штамм	Питательная среда	Содержание сухого вещества, мг/мл	АОА, % (M±m)(n=4)	
				Глубинное культивирование	Поверхностное культивирование
Е	Db-14	ГПС	5,0	13±3* [@]	10±1* [@]
	Db-18		5,0	10±1 [@]	18±2
	Dr-17		5,0	21±3	7±2* [@]
	Db-14	ККЭ	5,0	5±1* [@]	9±1* [@]
	Db-18		5,0	8±3 [@]	4±2 [@]
	Dr-17		5,0	12±1 [@]	9±4* [@]
	Db-14	ГС	5,0	4±1* [@]	1±1* [@]
	Db-18		5,0	12±2* [@]	9±1* [@]
	Dr-17		5,0	1±1 [@]	2±1 [@]
W	Db-14	ГПС	5,0	33±1	23±2
	Db-18		5,0	17±3 [§]	18±2
	Dr-17		5,0	26±4	19±3
	Db-14	ККЭ	5,0	26±1	30±3
	Db-18		5,0	1±1 [@]	7±2 [@]
	Dr-17		5,0	11±4 [@]	30±3
	Db-14	ГС	5,0	21±1	50±3 [@]
	Db-18		5,0	22±4	1±1 [@]
	Dr-17		5,0	2±1 [@]	9±3 [@]
Препараты сравнения	Дигидрокверцетин		0,5	34±5	
	Кислота галловая		5,0	31±5	
	Арбутин		5,0	26±3	
	Чай черный Greenfield		2,3	36±2	

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; АОА – антиоксидантная активность; ГПС – глюкозопептонная среда; ККЭ – среда с крахмалом и кукурузным экстрактом; ГС – среда с глюкозой и соевой мукой; М – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; * – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; [@] – отличие от показателей для всех положительных контролей по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; [§] – отличие от показателей для дигидрокверцетина и чая черного по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

На основании данных, представленных в таблице 30, выявлено, что 11 из 18 водных экстрактов мицелия *D. tricolor* показывали антиоксидантную активность, сравнимую с активностью препаратов сравнения (дигидрокверцетин, кислота галловая, арбутин, чай черный Greenfield). При этом водные экстракты из

мицелия *D. tricolor* Db-18 и *D. tricolor* Dr-17, выращенного в ККЭ или ГС, показали активность достоверно ниже, чем препараты сравнения.

Отмечено, что только водный экстракт из мицелия *D. tricolor* Db-14, выращенный поверхностным способом в ГС, проявлял достоверно более высокую активность, чем препараты сравнения. Все водные экстракты, полученные из культивируемого мицелия, выращенного на основе всех трех штаммов в ГПС, показывали антиоксидантную активность, сравнимую с активностью препаратов сравнения.

Среди этанольных экстрактов антиоксидантную активность, сравнимую с активностью препаратов сравнения (дигидрокверцетин, кислота галловая, арбутин, чай черный Greenfield), проявляли только экстракт мицелия *D. tricolor* Db-18 выращенного поверхностным способом в ГПС и экстракт мицелия *D. tricolor* Dr-17, выращенного глубинным способом в ГПС.

Водные экстракты из мицелия *D. tricolor* Db-14, *D. tricolor* Db-18, выращенного поверхностным способом в ГПС и ККЭ, *D. tricolor* Dr-17, выращенного глубинным способом в ГС проявили антиоксидантную активность достоверно выше, чем соответствующие этанольные экстракты *D. tricolor*.

Результаты исследований антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха показывают, что наиболее перспективными препаратами являются водные экстракты культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* Db-14.

В таблице 31 представлены результаты исследования антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 препаратов, полученных из плодовых тел и культивируемого мицелия *Fomes fomentarius*. Db-14, Db-18 и Dr-17,

Таблица 31 – Результаты анализа антиоксидантной активности экспериментальных образцов препаратов базидиального гриба *Fomes fomentarius* в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха

Препарат	Вид сырья	Содержание сухого вещества, мг/мл	АОА, % ($M \pm m$)(n=4)
Е	Плодовое тело	5,0	$6 \pm 1^{*@}$
	Культивируемый мицелий	5,0	$10 \pm 2^{*@}$
W	Плодовое тело	5,0	$3 \pm 1^{&@}$
	Культивируемый мицелий	5,0	$15 \pm 1^{\$}$
Препараты сравнения	Дигидрокверцетин	0,5	34 ± 5
	Кислота галловая	5,0	31 ± 5
	Арбутин	5,0	26 ± 3
	Чай черный Greenfield	2,3	36 ± 2

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; АОА – антиоксидантная активность в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха; M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего; n – число опытов; $*$ – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов при $p \leq 0,05$; $@$ – отличие от показателей для всех положительных контролей по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; $\$$ – отличие от показателей для дигидрокверцетина и чая черного по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; $\&$ – отличие от показателей для экстрактов из мицелия по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Как видно из таблицы 31, отмечено, что водный экстракт мицелия *Fomes fomentarius* показывает антиоксидантную активность, сравнимую с активностью кислотой галловой и арбутином, но достоверно более низкую, чем дигидрокверцетин и чай черный Greenfield. Отмечено, что водный экстракт из плодового тела и этанольные экстракты из плодового тела и культивируемого мицелия гриба показали активность достоверно ниже, чем все препараты сравнения (дигидрокверцетин, кислота галловая, арбутин, чай черный Greenfield).

3.5.3 Анализ токсичности образцов *in vitro*

Исследование токсичности экспериментальных образцов препаратов из высших грибов на перевиваемых клетках млекопитающих является первым этапом в системе доклинических испытаний новых лекарственных средств [86]. Результаты анализа токсичности препаратов грибов определяют ход дальнейших экспериментов по выявлению биологической активности.

Токсичность экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* исследовали на перевиваемых клеточных линиях Vero и MDCK. Результаты

анализа токсичности препаратов из плодовых тел и культивируемого мицелия, выращенного глубинным способом в ГПС, представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Результаты токсичности экспериментальных образцов препаратов гриба *Daedaleopsis tricolor* на перевиваемых клеточных линиях MDCK и Vero

Препарат	Вид сырья (субстрат или штамм)	Максимально переносимая концентрация для клеток MDCK, мг/мл	Максимально переносимая концентрация для клеток Vero, мг/мл
Е	Плодовое тело (село Вьюны; береза)	2,5	1,25
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	5,0	1,25
	Плодовое тело (поселок Кольцово; ива)	2,5	2,50
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	5,0	2,50
W	Плодовое тело (село Вьюны; береза)	2,5	1,00
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	0,5	2,50
	Плодовое тело (поселок Кольцово; ива)	5,0	2,50
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	5,0	2,50

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт

На основании данных, представленных в таблице 32, показано, что максимально переносимая концентрация препаратов *Daedaleopsis tricolor* для культур клеток MDCK и Vero находится в пределах от 0,5 до 5 мг/мл.

Для сравнения: концентрация препарата ацикловир, при которой гибель клеток Vero через 72 часа не превышала 50% (TC₅₀), составляла 0,5 мг/мл [40]. Максимально переносимая концентрация препарата ремантадин составила 0,05 мг/мл для клеточной линии Vero и 0,2 мг/мл для MDCK, а максимально переносимая концентрация арбидола составила 0,1 мг/мл для Vero и 0,05 мг/мл для MDCK [66].

3.5.4 Противоопухолевая активность *in vitro*

В связи с тем, что выявленная антиоксидантная активность может свидетельствовать о наличии противоопухолевой, экспериментальные образцы препаратов *Daedaleopsis tricolor* на основе водных экстрактов исследовали на цитостатическую активность, используя перевиваемую культуру клеток Нер-2 (карцинома гортани человека). Оценку цитотоксичности *in vitro* экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и культивируемого мицелия *D. tricolor* проводили по степени подавления роста клеток (N%) [85].

Данные, полученные в результате расчета степени подавления роста клеток, были использованы для определения величины IC_{50} для каждого образца исследуемых препаратов на основе водных экстрактов гриба *D. tricolor* и препарата сравнения. Построение линейной регрессионной зависимости степени подавления роста культуры клеток от концентрации наглядно демонстрировало концентрацию, ингибирующую рост клеток на 50% (IC_{50}). На рисунках 20 и 21 представлены графики данной зависимости для препаратов на основе водных экстрактов *D. tricolor*. На рисунке 22 представлен график зависимости степени подавления роста клеток от концентрации Цисплатина.

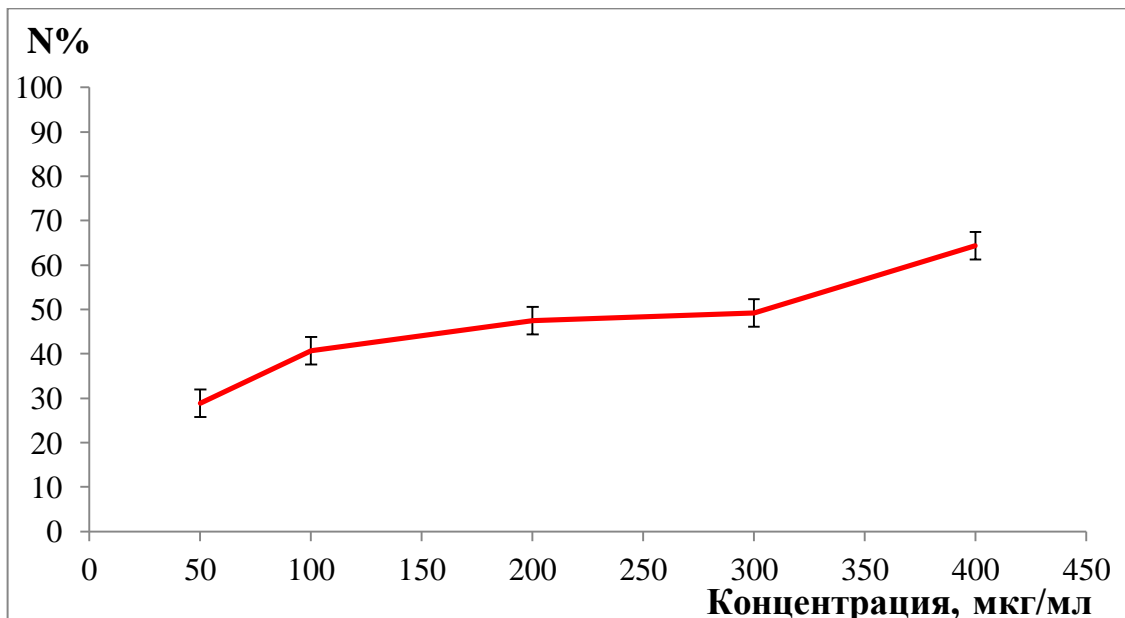


Рисунок 20 – График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации (в пересчете на сухое вещество) экспериментального образца препарата на основе водного экстракта из плодового тела *Daedaleopsis tricolor*

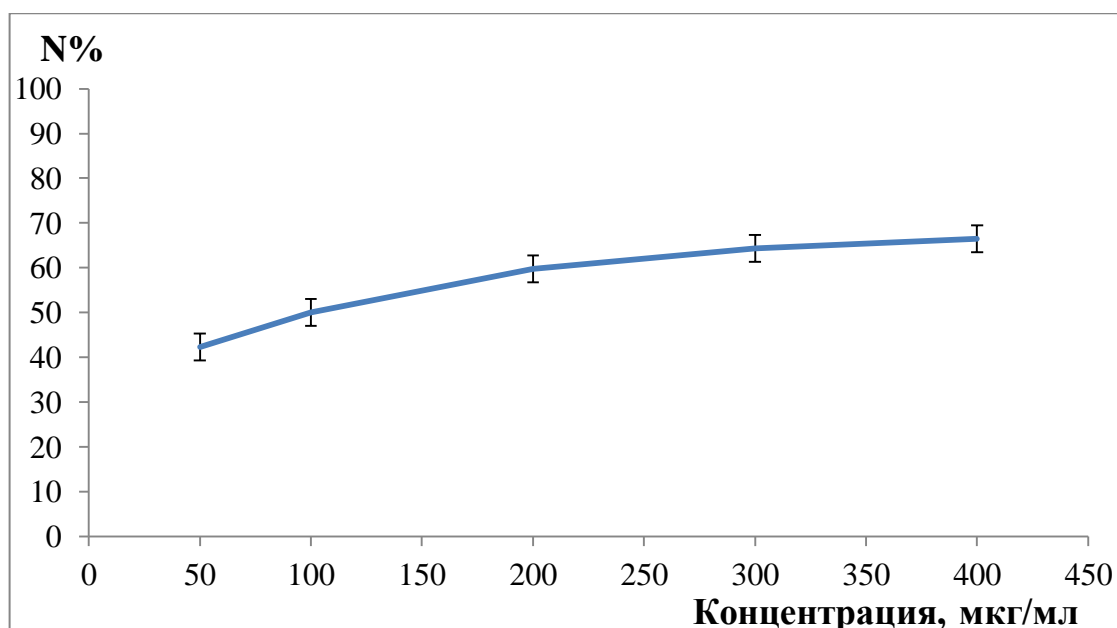


Рисунок 21 – График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации (в пересчете на сухое вещество) экспериментального образца препарата на основе водного экстракта из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* Db-18

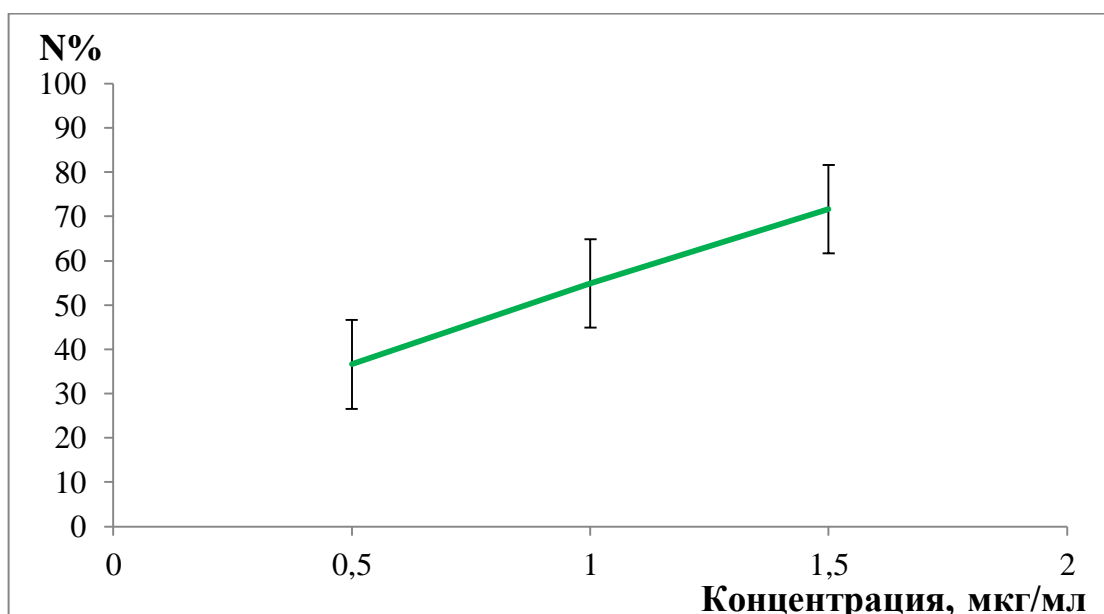


Рисунок 22 – График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации (в пересчете на сухое вещество) цисплатина.

В результате проведенных исследований выявлена цитотоксическая активность препаратов *Daedaleopsis tricolor* в отношении клеточной линии Нер-2. При этом IC_{50} водного экстракта из плодового тела составила 300 мкг/мл, а IC_{50} экстракта из культивируемого мицелия, выращенного глубинным способом в ГПС, составила 100 мкг/мл. IC_{50} препарата сравнения (Цисплатин) составила

0,9 мкг/мл. Таким образом, IC_{50} водного экстракта из культивируемого мицелия *D. tricolor* достоверно ниже, чем IC_{50} водного экстракта из плодового тела.

Исследование токсичности на нормальных (неопухолевых) клетках (п. 3.5.2), показало, что экспериментальные образцы препараты на основе водных экстрактов из мицелия и плодового тела *D. tricolor* в концентрациях до 500 мкг/мл достоверно не оказывали токсического действия на клетки MDCK и Vero (Таблица 36).

Экспериментальный образец препарата на основе водного экстракта из культивируемого мицелия *D. tricolor*, является перспективным агентом для дальнейшего изучения с целью получения нового противоопухолевого препарата.

3.5.5 Противовирусная активность *in vitro*

Исследована противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел и культивируемого мицелия базидиомицета *Daedaleopsis tricolor* в отношении ДНК-содержащих вирусов (вирус простого герпеса 2-го типа и вирус осповакцины) в культуре клеток Vero и РНК-содержащего вируса (вирус гриппа субтипов А/Н3N2 и А/Н5N1) в культуре клеток MDCK.

При исследовании ингибирования инфекционности вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS) экстрактами из плодовых тел и культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor* в сравнении с действием противогерпетического препарата Ацикловир (Акрихин, Россия) в монослое клеток Vero были получены результаты, представленные в таблице 33.

Таблица 33 – Противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* в отношении вируса простого герпеса 2-го типа

Препарат	Анализируемые образцы	Концентрация сухого вещества в среде культивирования, мг/мл	Титр ВПГ-2, lg ТЦД ₅₀ /мл (M±S _m , n=6)	Индекс нейтрализации (Титр _{контроль} - Титр _{опыт}), lg
Е	Плодовое тело (субстрат - береза)	1,25	2,50±0,00* ^{@§}	2,00
	Плодовое тело (субстрат - ива)	2,50	2,50±0,00* ^{@§}	2,00
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	1,25	2,33±0,17* ^{@§}	2,17
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	2,50	4,50±0,00 [@]	0,00
W	Плодовое тело (субстрат - береза)	1,00	3,50±0,00* [@]	1,00
	Плодовое тело (субстрат - ива)	2,50	3,67±0,17* [@]	0,83
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	2,50	4,33±0,27 [@]	0,17
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	2,50	4,50±0,00 [@]	0,00
Ацикловир (Акрихин, Россия)		0,10	<1,50±0,00*	>3,00
Контроль ВПГ-2 (без препарата)		—	4,50±0,00	—

Примечания: ВПГ-2 – вирус простого герпеса 2-го типа; М – среднее значение; S_m – стандартное отклонение; n – число лунок для каждого разведения вируса; * – отличие от контроля, рассчитанное по методу Спирмена-Кербера, при p≤0,05; [@] – отличие от показателей в присутствии Ацикловира, рассчитанное по методу Спирмена-Кербера, при p≤0,05; [§] – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов, рассчитанное по методу Спирмена-Кербера, при p≤0,05.

Как видно из таблицы 31, экспериментальные образцы препаратов из плодовых тел *Daedaleopsis tricolor*, проявляли противовирусный эффект в отношении ВПГ-2, судя по достоверному снижению титров вируса в их присутствии. Исследование противовирусного эффекта экспериментальных образцов препаратов, полученных из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*, выращенного глубинным способом в ГПС, в отношении вируса простого герпеса 2-го типа показало, что только этанольный экстракт мицелия (штамм Db-14) обладал противовирусной активностью. При этом она была сравнима с активностью этанольного экстракта из плодовых тел гриба (индексы нейтрализации вируса простого герпеса 2-го типа под действием этанольных

экстрактов из плодовых тел и мицелия гриба составили 2,00 и 2,17 lg соответственно).

В экспериментах *in vitro* противовирусную активность экспериментальных образцов грибных препаратов сравнивали с активностью коммерческого противогерпетического препарата Ацикловир (Акрихин, Россия) в отношении вируса простого герпеса 2-го типа. Как видно из таблицы 37, Ацикловир в концентрации 0,1 мг/мл среды, меньшей, чем для грибных препаратов, проявлял по сравнению с ними более высокую способность ингибировать данный вирус в экспериментах *in vitro* (таблица 33).

В следующей серии экспериментов в культуре клеток Vero была исследована противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* в отношении другого ДНК-геномного вируса – вируса осповакцины (штамм Л-ИВП). В этих экспериментах была обнаружена противовирусная активность у препаратов на основе этанольных и водных экстрактов плодовых тел гриба *Daedaleopsis tricolor* (таблица 34). Противовирусная активность в отношении вируса осповакцины была также обнаружена и для препаратов на основе этанольного экстракта мицелия *Daedaleopsis tricolor* Db-14, выращенного в ГПС, в то время как препарат на основе водного экстракта мицелия гриба таковой активностью не обладал.

В процессе исследования не было обнаружено способности экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor*, подавлять цитопатическое действие штаммов вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) в монослое клеток MDCK. В связи с этим результаты определения титров вирусов гриппа при культивировании с экспериментальными образцами препаратов и в соответствующем контроле (без препаратов) в данном разделе не приведены.

Таблица 34 – Противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов *Daedaleopsis tricolor* в отношении вируса осповакцины

Препарат	Анализируемые образцы	Концентрация сухого вещества в среде культивирования, мг/мл	Титр ВОВ, lg БОЕ/мл ($M \pm S_m$, n=4)	Индекс нейтрализации (Титр _{контроль} - Титр _{опыт}), lg
Е	Плодовое тело (субстрат - береза)	0,25	4,02±0,05*§	2,22
	Плодовое тело (субстрат - ива)	0,50	5,00±0,11*	1,24
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	0,25	4,02±0,06*§	2,22
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	0,50	6,19±0,08	0,05
W	Плодовое тело (субстрат - береза)	0,20	4,93±0,08*	1,31
	Плодовое тело (субстрат - ива)	0,50	5,42±0,04*	0,82
	Культивируемый мицелий (штамм Db-14)	0,50	6,22±0,05	0,02
	Культивируемый мицелий (штамм Dr-17)	0,50	6,24±0,04	0,00
Контроль ВПГ-2 (без препарата)		—	6,24±0,05	—

Примечания: **Е** – этанольный экстракт; **W** – водный экстракт; ВОВ – вирус осповакцины; М – среднее значение; S_m – стандартное отклонение; n – число повторов десятикратных разведений вируса; @ – отличие от контроля по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; § – отличие от показателей соответствующих водных экстрактов по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Таким образом, экспериментальные образцы препаратов на основе этанольных экстрактов из плодовых тел и культивируемого мицелия штамма Db-14 гриба *Daedaleopsis tricolor*, обладали противовирусной активностью в отношении ДНК-геномных вирусов – вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS) и вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) в культуре клеток Vero, в то время как в отношении РНК-геномного вируса – вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 исследуемые экспериментальные образцы препаратов не проявляли противовирусной активности в культуре клеток MDCK.

Заключение к п. 3.5

Тестирование биологической активности препаратов высших базидиомицетов показало, что препараты гриба *Daedaleopsis tricolor* проявляют антиоксидантную активность в реакции окисления Твина-80, противоопухолевый эффект в отношении культуры клеток Нер-2 и противовирусную активность в отношении ДНК-содержащих вирусов (таблица 35).

Таблица 35 – Результаты тестирования биологической активности экспериментальных образцов препаратов базидиомицета *Daedaleopsis tricolor*

Источник	Препарат	Активность
Плодовое тело	W	Противоопухолевая (в отношении Нер-2)
Плодовое тело	E	Противовирусная (в отношении вируса осповакцины и вируса простого герпеса 2-го типа)
Мицелий	W	Антиоксидантная (сопоставима с галловой кислотой, арбутином и дигидрокверцетином), противоопухолевая (в отношении Нер-2)
Мицелий	E	Антиоксидантная (сопоставима с галловой кислотой, арбутином и дигидрокверцетином), противовирусная (в отношении вируса осповакцины и вируса простого герпеса 2-го типа)

Примечания: E – этанольный экстракт; W – водный экстракт;

Результаты исследования биологической активности экспериментальных образцов препаратов а *Daedaleopsis tricolor* свидетельствуют, что препараты, полученные из культивируемого мицелия гриба, показывают антиоксидантную и противоопухолевую активность выше в сравнении с препаратами из плодовых тел данного базидиомицета.

Штаммы *D. tricolor* Db-14 (коллекционный номер F-1315), *D. tricolor* Db-18 (коллекционный номер F-1314) и *D. tricolor* Dr-17 (коллекционный номер F-1330) депонированы в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» с указанием их места выделения, субстрата, систематического положения, биологической активности, культурально-морфологических особенностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание новых лекарственных препаратов является одной из актуальных задач современной фармацевтической промышленности. В последние годы повысился интерес к лекарственным средствам природного происхождения. Препараты на основе высших базидиомицетов вызывают вполне логичный интерес у исследователей, разрабатывающих новые лекарственные средства, обладающие высокой биологической активностью, низкой токсичностью при минимуме побочных эффектов.

Однако, не смотря на то, что интерес к высшим базидиомицетам непрерывно растет, многие научные исследования, как правило, лишь констатируют наличие каких-либо полезных свойств и активностей, характеризующих конкретный гриб и его метаболиты с положительной стороны.

Проведенные в настоящей работе исследования способствуют обоснованию возможности применения полученных экспериментальных образцов препаратов из некоторых базидиомицетов в качестве компонентов или самостоятельных лекарственных средств для нужд фармакологии, биотехнологии и медицины.

Установлены оптимальные значения технологических параметров процесса получения экспериментальных образцов препаратов на основе этанольных и водных экстрактов из высших грибов. Выявлены закономерности извлечения БАВ из грибного сырья на примере ксилотрофного гриба *Fomes fomentarius* в зависимости от технологических параметров. Показано, что температура экстракции и концентрация экстрагента являются наиболее значимыми параметрами процесса. Общее время экстрагирования является менее значимым параметром, т.к. при существенном увеличении времени экстракции наблюдается незначительный прирост выхода экстрактивных веществ из гриба.

Т.к. измельченные плодовые тела *Fomes fomentarius* являются трудным с технологической точки зрения сырьем, то технология выделения комплекса БАВ универсальна для плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов.

Разработанная технология апробирована на высших грибах *Amanita muscaria*, *Bjerkandera adusta*, *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus*, *Daedaleopsis confragosa*, *D. tricolor*, *Duddingtonia flagrans*, *Flammulina velutipes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Phallus impudicus*, *Phellinus igniarius*, *Piptoporus betulinus*, *Steccherinum ochraceum*, *Trametes ochracea*, *T. suaveolens*, *T. trogii*, *T. versicolor*, *Trichaptum biforme*.

Исходя из этого, предложенную технологию получения экспериментальных образцов препаратов на основе водных и этанольных экстрактов рекомендуется применять для создания лекарственных препаратов из ряда высших базидиомицетов.

Перевод в чистую культуру высших базидиомицетов с целью получения мицелиальной биомассы грибов биотехнологическими методами является перспективным для создания лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантной, противоопухолевой, противовирусной активностями.

Исследование литературных данных показало, что плодовые тела дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* являются перспективными источниками для создания новых препаратов. В то же время данный вид является малоизученным с точки зрения биотехнологии. Таким образом, *D. tricolor* был выбран для введения в культуру новых штаммов-продуцентов.

Выделено в культуру три штамма гриба *D. tricolor* из плодовых тел, собранных в разных местах произрастания (село Вьюны Колыванский район, поселок Кольцово Новосибирский район в Новосибирской области), с разных субстратов (береза, ива), в разное время (август 2013 г., сентябрь 2013 г.).

На основе выделенных штаммов *D. tricolor* Db-14, *D. tricolor* Db-18 и *D. tricolor* Dr-17 получена сухая биомасса гриба *D. tricolor* методами поверхностного и глубинного культивирования.

Глубинный способ культивирования базидиомицетов имеет заметные преимущества перед поверхностным. К таким преимуществам относятся временной фактор, возможность использования ферментеров с большим объемом

питательной среды и, как следствие, объемом конечного продукта. Исходя из приведенных факторов, погруженное культивирование является наиболее перспективным для разработки технологии культивирования гриба *D. tricolor* в промышленных условиях.

Разработаны методики качественного анализа флавоноидов, тритерпенов и каротиноидов в препаратах из высших базидиомицетов на основе тонкослойной хроматографии. Для анализа тритерпенов и каротиноидов выбрана система растворителей бутанол – аммиак концентрированный – этиловый спирт 96% (10:4:4), а для анализа флавоноидов выбрана система растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3).

Разработаны экспресс-методики количественного анализа суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в препаратах из базидиальных грибов. Достоинствами разработанных методик являются простота, скорость, использование общелабораторного оборудования, малые объемы исследуемых проб и реактивов, возможность проведения серийных анализов для нескольких десятков образцов. Разработанные методики анализа содержания фенольных соединений и флавоноидов рекомендованы для характеристики высших грибов и растений как природного, так и биотехнологического происхождения.

Содержание полисахаридов в экспериментальных образцах препаратов из плодового тела *Daedaleopsis tricolor* достоверно выше, чем в экспериментальных образцах препаратов из мицелия, выращенного на ГПС. Кроме того, содержание фенольных соединений в экспериментальных образцах препаратов из плодового тела гриба достоверно выше, чем в экспериментальных образцах препаратов из культивируемого мицелия.

Выход экстрактивных веществ, извлекаемых как 70% этанолом, так и водой дистиллированной, из мицелия достоверно выше, чем из плодового тела. С учетом выхода экстрактивных веществ рассчитано содержание суммарного белка, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов в пересчете на сухое сырье грибов *Daedaleopsis tricolor* и *Fomes fomentarius*.

Показано, что содержание полисахаридов, суммарного белка, фенольных соединений и флавоноидов в мицелии гриба *Daedaleopsis tricolor* при выбранных условиях культивирования достоверно выше, чем в плодовых телах. Максимальная кратность превышения содержания полисахаридов, суммарного белка, фенольных соединений и флавоноидов в мицелии гриба над плодовыми телами составляла 669 %, 270 %, 142 %, 225 % соответственно.

Отмечено, что содержание суммарного белка и полисахаридов в пересчете на сухой мицелий *Fomes fomentarius* достоверно выше, чем содержание суммарного белка и полисахаридов пересчете на плодовое тело *F. fomentarius*. В то же время в плодовых телах гриба наблюдалось более высокое содержание фенольных соединений и флавоноидов, чем в сухой биомассе гриба.

Экспериментальные образцы препаратов на основе экстрактов из плодовых тел и культивируемого мицелия гриба *D. tricolor* показывали низкую токсичность на перевиваемых культурах клеток MDCK и Vero. При этом минимально токсическая концентрация препаратов в отношении клеточной линии MDCK составляла от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл, а в отношении клеточной линии Vero – от 1,25 мг/мл до 2,5 мг/мл.

Выявлено, что почти все экспериментальные образцы препаратов на основе водных экстрактов мицелия *D. tricolor* показали антиоксидантную активность в реакции окисления Твин-80 кислородом воздуха, сравнимую с препаратами сравнения (дигидрокверцетин, кислота галловая, арбутин). Исключением являются некоторые экспериментальные образцы препаратов на основе водных экстрактов из мицелия *D. tricolor* Db-18 и *D. tricolor* Dr-17, выращенного в ККЭ или ГС, которые показали активность достоверно ниже, чем препараты сравнения.

Экспериментальный образец препарата на основе водного экстракта из мицелия *D. tricolor* Db-14, выращенного поверхностным способом в ГС, проявлял достоверно более высокую активность, чем препараты сравнения. Большинство экспериментальных образцов препаратов на основе этанольных экстрактов мицелия проявляет достоверно более низкую антиоксидантную активность в

сравнении со стандартными образцами. Антиоксидантную активность, сравнимую с активностью препаратов сравнения, проявляли только экспериментальный образец препарата на основе этанольных экстрактов из мицелия *D. tricolor* Db-18, выращенного поверхностным способом в ГПС, и экспериментальный образец препарата на основе этанольных экстрактов из мицелия *D. tricolor* Dr-17, выращенного глубинным способом в ГПС.

Выявлена цитотоксическая активность экспериментальных образцов препаратов на основе водных экстрактов *D. tricolor* в отношении перевиваемой клеточной линии Нер-2 (карцинома гортани человека). При этом 50%-ная ингибирующая концентрация (IC_{50}) препарата из плодового тела гриба составила 300 мкг/мл, а IC_{50} препарата из мицелия *D. tricolor* Db-18 – 100 мкг/мл.

Показана противовирусная активность препаратов на основе этанольных экстрактов из плодового тела и из культивируемого мицелия в отношении вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) и вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS). Индексы нейтрализации вируса осповакцины и вируса простого герпеса 2-го типа под действием этих препаратов из плодовых тел данного гриба на клетках Vero составили 1,5-2,0 и 2,0 lg соответственно, а под действием препарата из мицелия *D. tricolor* Db-14 индексы нейтрализации вируса осповакцины и вируса простого герпеса 2-го типа составили 2,5 и 2,17 lg соответственно.

Результаты исследований антиоксидантной и противоопухолевой активностей показали, что экспериментальные образцы препаратов из культивируемого мицелия *D. tricolor*, в большинстве случаев показывают биологическую активность выше, чем экспериментальные образцы препаратов, выделенные из плодовых тел гриба.

Штаммы *D. tricolor* Db-14 (коллекционный номер F-1315), *D. tricolor* Db-18 (коллекционный номер F-1314) и *D. tricolor* Dr-17 (коллекционный номер F-1330) депонированы в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Показано, что штамм *D. tricolor* Db-14 является перспективным биотехнологическим источником для разработки и получения новых лекарственных препаратов.

Создание нового лекарственного средства является многоэтапным долговременным процессом. Полученные автором результаты исследований высших базидиомицетов являются предварительными для разработки лекарственных препаратов природного происхождения, обладающих широким спектром биологической активности.

Дальнейшие исследования следует направить на масштабирование процесса культивирования перспективных высших базидиомицетов, таких как *Daedaleopsis tricolor*. Изучение противоопухолевой и противовирусной активностей экспериментальных образцов препаратов биотехнологического происхождения *in vivo* является одним из первых этапов доклинического исследования лекарственных средств. Впоследствии, выделение групп БАВ из экспериментальных образцов препаратов базидиомицетов, показавших наивысшую биологическую активность, позволит достоверно установить параметры для стандартизации разрабатываемых лекарственных средств.

Выбор лекарственной формы и ее биофармацевтическая оценка являются одними из важнейших задач для разработки и создания новых препаратов. Сухие грибные экстракты являются гигроскопичными, кроме того, их вкус не всегда приятен. Поэтому можно предположить, что в качестве лекарственной формы для препаратов на основе сухих экстрактов грибов будут наиболее приемлемыми твердые желатиновые капсулы, т.к. они обладают рядом преимуществ: точность дозирования, высокая биодоступность, высокая стабильность, корректирующая способность, эстетичность и другие.

Исходя из вышесказанного, предполагается, что сухие экстракты из культивируемого мицелия высших базидиомицетов в твердых желатиновых капсулах – конечный результат многоэтапного исследования по созданию нового препарата, обладающего широким спектром биологической активности.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология выделения комплекса биологически активных веществ из плодовых тел и культивируемого мицелия высших базидиомицетов.
2. В чистую культуру выделены три штамма ксилотрофного гриба *Daedaleopsis tricolor* из дикорастущих плодовых тел, собранных в лесных массивах Новосибирской области.
3. Разработаны экспресс-методики биохимического анализа препаратов природного происхождения на содержание групп БАВ: белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов.
4. Выявлено, что содержание групп биологически активных соединений в мицелии *Daedaleopsis tricolor*, выращенном при выбранных условиях, достоверно выше, чем в плодовых телах.
5. Впервые установлено, что антиоксидантная и противоопухолевая активности экспериментальных образцов препаратов мицелия *Daedaleopsis tricolor*, выращенном по разработанной технологии культивирования данного гриба, достоверно выше, чем у аналогичных препаратов из диких плодовых тел.
6. Противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов на основе этанольных экстрактов *Daedaleopsis tricolor* в отношении вируса осповакцины (Л-ИВП) и вируса простого герпеса 2-го типа (MS) показана впервые.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Таблицы

№	Название	Страница
1	Биологическая активность ксилотрофных базидиомицетов <i>Daedaleopsis tricolor</i> , <i>Daedaleopsis confragosa</i> , <i>Fomes fomentarius</i>	23
2	Выход экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> в зависимости от метода экстракции	67
3	Выход экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> и содержание флавоноидов в пересчете на сухой экстракт в зависимости от концентрации этанола в экстрагенте	69
4	Выход экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> при различных соотношениях сырья к экстрагенту	72
5	Влияние температуры и времени экстракции на выход экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> и содержание белка, полисахаридов, флавоноидов в пересчете на сухой экстракт	73
6	Выход экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> в зависимости от температуры и времени экстракции	74
7	Многофакторный анализ технологических параметров процесса извлечения БАВ из плодовых тел базидиального гриба <i>Fomes fomentarius</i> водно-этанольной смесью	76
8	Выход водорастворимых экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> в зависимости от температуры	78
9	Выход водорастворимых экстрактивных веществ из плодовых тел <i>Fomes fomentarius</i> в зависимости от времени экстракции	79
10	Перечень грибов, из которых были получены сухие экстракты по разработанной автором технологии выделения комплекса БАВ	80
11	Состав питательных сред для культивирования гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i>	92
12	Содержание сухой биомассы мицелия при культивировании <i>Daedaleopsis tricolor</i> в динамических и стационарных условиях	97
13	Модельная система для анализа флавоноидов методом ТСХ в системе растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (20:2:3)	100
14	Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание белка	102
15	Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание полисахаридов	104
16	Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе на содержание фенольных соединений	106
17	Оптическая плотность различных составов реакционной смеси для трех длин волн при анализе на содержание флавоноидов	109
18	Физические и органолептические свойства экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i>	113
19	Физические и органолептические свойства экспериментальных образцов препаратов из мицелия гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i>	114
20	Анализ препаратов экспериментальных образцов препаратов гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> методом ТСХ на каротиноиды и тритерпены в системе растворителей бутанол – аммиак концентрированный – 96% этанол	115

№	Название	Страница
21	Анализ экспериментальных образцов препаратов на основе этанольных экстрактов гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> методом ТСХ на флавоноиды	116
22	Анализ экспериментальных образцов препаратов на основе водных экстрактов гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> методом ТСХ на флавоноиды	117
23	Качественный состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и мицелия <i>Daedaleopsis tricolor</i>	118
24	Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела <i>Daedaleopsis tricolor</i>	119
25	Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия <i>Daedaleopsis tricolor</i> (глубинное культивирование)	120
26	Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия <i>Daedaleopsis tricolor</i> (поверхностное культивирование)	121
27	Биохимический состав экспериментальных образцов препаратов из плодового тела и культивируемого мицелия <i>Fomes fomentarius</i>	124
28	Результаты анализа железо-восстанавливающей способности экспериментальных образцов препаратов <i>Daedaleopsis tricolor</i> и <i>Fomes fomentarius</i>	129
29	Результаты анализа антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха экспериментальных образцов препаратов из плодовых тел <i>Daedaleopsis tricolor</i>	131
30	Результаты анализа антиоксидантной активности в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха экспериментальных образцов препаратов из культивируемого мицелия <i>Daedaleopsis tricolor</i>	132
31	Результаты анализа антиоксидантной активности экспериментальных образцов препаратов базидиального гриба <i>Fomes fomentarius</i> в реакции торможения окисления Твин-80 кислородом воздуха	134
32	Результаты токсичности экспериментальных образцов препаратов гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> на перевиваемых клеточных линиях MDCK и Vero	135
33	Противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов <i>Daedaleopsis tricolor</i> в отношении вируса простого герпеса 2-го типа	139
34	Противовирусная активность экспериментальных образцов препаратов <i>Daedaleopsis tricolor</i> в отношении вируса осповакцины	141
35	Результаты тестирования биологической активности экспериментальных образцов препаратов базидиомицета <i>Daedaleopsis tricolor</i>	142

Рисунки

№	Название	Страница
1	Программа разработки технологии экспериментальных образцов препаратов	44
2	Схема введения в культуру гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i>	47
3	Плодовое тело <i>Fomes fomentarius</i> измельченное (увеличение ×100)	71
4	Плодовое тело <i>Fomes fomentarius</i> измельченное (увеличение ×400)	71
5	Плодовые тела, из которых были выделен штамм Db-14, колонии гриба на чашке Петри, микроскопические фотографии мицелия гриба, выращенного в чистой культуре на жидкой питательной среде глубинным и поверхностным методом (a-e)	85
6	Плодовые тела, из которых были выделен штамм Db-18, колонии гриба на чашке Петри, микроскопические фотографии мицелия гриба, выращенного в чистой культуре на жидкой питательной среде глубинным и поверхностным методом (a-e)	86
7	Плодовые тела, из которых были выделен штамм Dr-17, колонии гриба на чашке Петри, микроскопические фотографии мицелия гриба, выращенного в чистой культуре на жидкой питательной среде глубинным и поверхностным методом (a-e)	87
8	Культура гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Db-14) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес.	88
9	Культура гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Db-18) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес.	89
10	Культура гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Dr-17) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 1 мес.	89
11	Культура гриба <i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Dr-17) на ООА с микофильными грибами, возраст колонии 2 мес.	89
12	Гриб <i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Db-18) на скошенном агаре	90
13	<i>Daedaleopsis tricolor</i> (штамм Dr-17), 5-7 суток глубинного культивирования (a-e)	94
14	<i>Daedaleopsis tricolor</i> , 32-33 суток поверхностного культивирования (a-e)	96
15	Калибровочный график по БСА	103
16	Калибровочный график по глюкозе	105
17	Калибровочный график по галловой кислоте	107
18	Калибровочный график по дигидрокверцетину	111
19	Железо-восстанавливающая способность экспериментальных образцов препаратов <i>Daedaleopsis tricolor</i> и <i>Fomes fomentarius</i> в сравнении со стандартными образцами	128
20	График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации (в пересчете на сухое вещество) экспериментального образца препарата на основе водного экстракта из плодового тела <i>Daedaleopsis tricolor</i>	136
21	График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации (в пересчете на сухое вещество) экспериментального образца препарата на основе водного экстракта из культивируемого мицелия <i>Daedaleopsis tricolor</i>	137
22	График зависимости степени подавления роста культуры клеток Нер-2 от концентрации цисплатина.	137

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1 типа

ТЦД_{50%} – 50% тканевая цитопатическая доза

ГСО – государственный стандартный образец

ООА – овсяной отвар агаризованный

КГА – картофельно-глюкозный агар

МКА – меласса-кукурузный экстракт-агар

СОП – стандартная операционная процедура

ГПС – глюкозопептонная среда

ККЭ – среда, содержащая крахмал и кукурузный экстракт

ГС – среда, содержащая глюкозу и соевую муку

IC₅₀ – концентрация, ингибирующая рост клеток на 50%

ТСХ – тонкослойная хроматография

БСА – бычий сывороточный альбумин

СВЧ – сверхвысокие частоты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИН – индекс нейтрализации

ВКЖ – вируссодержащая культуральная жидкость

БОЕ – бляшкообразующая единица

Y_E – выход экстрактивных веществ из сырья (этанольный экстракт)

Y_W – выход экстрактивных веществ (водный экстракт)

C_{Et} – концентрация этанола в экстрагенте

R – соотношение сырья к экстрагенту

τ – время экстракции общее

T – температура экстракции

C_B – содержание белков в сухом экстракте

$C_{ПС}$ – содержание полисахаридов в сухом экстракте

$C_{ФЛ}$ – содержание флавоноидов в сухом экстракте

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ангаскиева А.С., Андреева В.Ю., Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н., Бородышена Е.А., Харина Т.Г. Исследование химического состава серпухи венценосной, культивируемой в Сибири // Химия растительного сырья. – 2003. – №4. – С. 47–50.
2. Арефьев С.П. Системный анализ биоты дереворазрушающих грибов / С.П. Арефьев. – Новосибирск: Наука, 2010. – 260 с.
3. Арефьев С.П. Системный анализ биоты дереворазрушающих грибов [Тюмен. гос. ун-т]: автореф. дис... на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук: 03.00.16 / С.П. Арефьев. – Тюмень: ТЮМГУ, 2006. – 47 с.
4. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В., Меланиновый комплекс гриба *Inonotus obliquus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – №4. – С. 439-444.
5. Балабаев В.С., Антипова Л.В. Хитин и хитозан // Материалы XXI Века. – 2012. – №6.
6. Барков А.В., Шуктуева М.И., Тиунов И.А., Винокуров В.А., Краснопольская Л.М. Использование методов оптимизации питательных сред для выявления штаммов базидиомицетов, активно утилизирующих липиды // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20. – № 4. – С. 98-104.
7. Бекетова Г.В., Савичук Н.О., Савичук А.В. Клиническая эффективность микотона в лечении хронических поражений верхних отделов пищеварительного тракта // Успехи медицинской микологии. – 2001. – Т 1. – С. 229-230.
8. Беликов В.В. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. – 1970. – №1. – С. 68.
9. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии: учебное пособие для вузов / В.В. Бирюков – М.: Колосс, 2004. – 296 с.
10. Блажей, А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. – М.: Мир. – 1977. – 158 с.
11. Бондарцев А.С. Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1953. – 1106 с.
12. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов: монография. – М.: Мир, 1986.– 422 с.
13. Бубенчикова В.Н., Азарова А.В. Стандартизация сырья Девясила иволистного (*Inula salicina* L.) по содержанию гидроксикоричных кислот // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2.
14. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре: монография. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
15. Велешко И.Е., Велешко А.Н., Румянцева Е.В., Буданцева Н.А., Гальбрайт Л.С., Сушинская Н.В., Курченко В.П. Использование меланина из трутовика настоящего (*Fomes fomentarius*) для удаления радионуклидов ^{233}U , ^{239}Pu и ^{152}Eu из растворов // Труды Белорусского государственного университета. – 2011. – Т. 6. – Ч. 1. – С. 144-151.
16. Ветчинкина Е.П., Никитина В.Е., Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Смирнов Д.А., Осадчая О.В. Динамика образования гликопротеинов и высокомолекулярных фенолов

- грибом *Lentinus edodes* в условиях глубинного культивирования // Самарская Лука. 2008. – Т. 17. – № 24 – Вып. 2. – С. 367-372.
17. Власенко В.А., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А., Косогова Т.А., Бардашова А.В., Псурцева Н.В. Изучение противовирусной активности лекарственных грибов рода *Phellinus* S.L. в Западной Сибири // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – Вып. 4. – № 90. – С. 29-31.
 18. Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Теплякова Т.В., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Сухих А.С. Антиретровирусная активность меланинов из природной и культивируемой чаги (*Inonotus obliquus*) // Материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – 2014. – Т. 12. – С. 299-301.
 19. Гвоздиков Т.С., Мишин Л.Т., Черноок Т.В., Пленина Л.В., Капич А.Н. Глубинный мицелий ксантофилсодержащего гриба *Laetiporus sulphureus* - основа новой биологически активной добавки // Успехи медицинской микологии - 2004. – Т. 3. – С. 218-220.
 20. Герасименко Д.В., Авдиенко И.Д., Банникова Г.Е., Зуева О.Ю., Варламов В.П. Антибактериальная активность водорастворимых низкомолекулярных хитозанов в отношении различных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40. – №3. – С. 301-306.
 21. Гибридный белок, штамм бактерий *Escherichia coli* - продуцент гибридного белка и способ получения безметионинового интерферона альфа-2b человека из этого гибридного белка: пат. 2441072 Рос. Федерация: МПК С 12 Р 21/06 / Губайдуллин И. И., Яковенко А. Р., Козлов Д. Г., Чеперегин С. Э., Казаров А. А.; заявитель и патентообладатель Москва, ин-т генетики и селекции промышленных микроорганизмов. – № 2010153592/10; заявл. 28.12.2010; опубл. 27.01.2012.
 22. Гилева И.П., Бардашева А.В., Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Казачинская Е.И., Косогова Т.А., Теплякова Т.В. Противовирусные белки из базидиального гриба *Daedaleopsis confragosa* // Материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – 2014. – Т. 12. – С. 302-303.
 23. Гончарова Н.В. Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus* / Н.В. Гончарова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – Вып. 4. – С. 434-437.
 24. Гордиенко Н.И., Федорова Т.Е., Иванова С.З., Бабкин В.А. Влияние экстрагента на компонентный состав фенольного комплекса, извлекаемого из коры лиственницы Гмелина // Химия растительного сырья. – 2008. – №2. – С. 35-38.
 25. Горовой Л.Ф. Препарат Микотон, полученный из высших базидиальных грибов // Успехи медицинской микологии. – 2001. – Т. 1. – С. 271-273.
 26. Горшина Е.С. Технология получения биологически активной субстанции лекарственного гриба кориола опушенного / Е.С. Горшина, М.М. Скворцова, В.В. Бирбков // Биотехнология. – 2003. – № 2. – С. 45-53.
 27. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издание (2 часть) Издательство: Москва. – 2010. – 600 с.
 28. Государственная фармакопея СССР: Вып.2 Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье/ МЗ СССР. – 11-изд. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

29. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов и факультетов / Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
30. Давыдова В. Н., Нагорская В. П., Горбач В. И., Калитник А. А., Реунов А. В., Соловьева Т. Ф., Ермак И. М. Антивирусная активность хитозанов: зависимость от структуры и способа деполимеризации // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – № 1. – С. 103-108.
31. Дейнека В. И., Лабунская Н. А., Сорокопудова О. А. Каротиноиды и антоцианы листочков околоцветников некоторых видов и сортов лилий (*Lilium* L.) // Вестник ВГУ. – 2008. – № 2.
32. Досон, Р. Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: справочное пособие / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М. Мир, 1991. – 544 с.
33. Древаль К.Г., Бойко М.И. Целлюлазы из культуральной жидкости базидиомицетов // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6. – Вып. 2. – №150. – С. 107-114.
34. Дренин, А.А. Флавоноиды и изофлавоноиды трех видов растений родов *Trifolium* L. и *Vicia* L.: автореф. дисс. канд. хим. наук / А.А. Дренин. Сургут: СурГУ ХМАО - Югры, 2008. – 24 с.
35. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии: справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
36. Ермолаева Е. О., Позняковский В. М. Разработка новой промышленной технологии сухих растительных экстрактов // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 6 – С. 10-13.
37. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
38. Зобкова З.С., Щербакова С.А. Новые методы контроля биохимического состава продуктов с компонентами нетрадиционного сырья // Молочная промышленность. – 2002. – № 7. – С. 11-13.
39. Ибрагимова Ж.Б., Макаревич Е.В., Косогова Т.А., Мазурков О.Ю., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А. Противогриппозная активность водных экстрактов макро- и микромицетов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4.
40. Иванов А.В., Симонян А.Р., Беланов Е.Ф., Александрова Л.А. Новые 5-замещенные производные 2'-дезоксинуридина: синтез и антивирусная активность // Биоорганическая химия. – 2005. – Т. 31. – С. 616-622.
41. Иванова Н.В., Малков Ю.А., Бабкин В.А. Характеристические параметры процесса экстракции коры лиственницы этилацетатом // Химия растительного сырья. – 2008. – №2. – С. 39-42.
42. Иванова С.З., Горшков А.Г., Кузьмин А.В., Гордиенко И.И., Бабкин В.А. Фенольные соединения луба лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина химия растительного сырья. – 2011. – №2. – С. 107-112.
43. Ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека 1 типа: пат. 2375073 Рос. Федерация: МПК А 61 К 38/06 / Теплякова Т.В., Гашникова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А.; заявитель и патентообладатель Кольцово, Государственный научный

- центр вирусологии и биотехнологии "Вектор". – № 2008124179/15; заявл. 11.06.2008; опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34. 14 с: ил.
44. Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Квачева З.Б., Николаева С.Н., Шишкина Л.Н., Галкин С., Хатакка А., Конопля Е.Ф., Верещако Г.Г., Ходосовская А.М., Рутковская Ж.А. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – С. 146.
 45. Квачева З.Б., Капич А.Н., Вотяков В.И., Николаева С.Н. Противовирусная активность экстрактов мицелия базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т.5. – С. 271-273.
 46. Киселева О.В., Миронов П.В., Литовка Ю.А. Морфологические особенности базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в поверхностной и глубинной культуре // Вестник Красноярского Государственного аграрного университета. – 2012. – №1. – С. 91-95.
 47. Киселева О.В., Миронов П.В., Литовка Ю.А., Терентий С.В. Глубинное культивирование серно-желтого трутовика с целью получения белковой биомассы // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С. 337-338.
 48. Ковалева А.В., Кузьминых О.В., Лашенко Е.Ю., Древаль К.Г., Каниболоцкая Л.В., Бойко М.И., Шендрик А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих макромицетов // Вісник донецького національного університету. – 2013. – № 1. – С. 136-139.
 49. Ковалева Г.К. Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (VILL.: FR.) BOND. ET SING., *Ganoderma applanatum* (PERS.) PAT. и *Trametes versicolor* (L.:FR.) PILAT : автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук: / Г.К. Ковалева. – Москва: СибГТУ, 2009. – 23 с.
 50. Ковалева Г.К., Громовых Т.И. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета G.a.-04 *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pal // Вестник КрасГАУ. – 2008. – №1. – С. 70-73.
 51. Кожемякина, Н. В. Иммунобиологическая активность мицелия *Fomes fomentarius* (L.: FR.) Fr. и выделенных из него углеводных фракций / Н. В. Кожемякина, Е. П. Ананьева, С. В. Гурина // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 27-30.
 52. Коломийчук С.Г., Бошков Л. З. Использование микроволновой технологии для повышения эффективности экстрагирования биологически активных веществ из грибов // Вестник ВНМУ. – 2007. – Т 11. – Вып. 2. – №2.
 53. Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. Количественный масс-спектрометрический анализ содержания белков в биологических пробах без использования изотопных меток // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – В. 2. – С 125-139.
 54. Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Боева С.Е. Оптимизация параметров экстрагирования физиологически ценных компонентов *Stevia rebaudiana* В. // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 4. – С. 16-19.
 55. Корма, комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов: ГОСТ Р 26176-1991. – Введ. 1993-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1991. – 9 с.: ил.

56. Короткова Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов // Журнал физической химии. – 2000. – Т. 74. – №9. – С. 1544–1546.
57. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстиков; Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-т органической химии. – Новосибирск: Академическое изд-во "Тео", 2007. – 232 с.
58. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов: автореф. дисс... канд. биол. наук / Т.А. Косогова. – Кольцово: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 2013. – 26 с.
59. Красуцкий Б.В. Первые данные о ксилотрофных базидиальных грибах (Fungi, Basidiomycetes) Челябинского городского бора // Вестник Ишимского Государственного педагогического института им. П.П. Ершова. – 2013. – Вып.6. – № 12. – С. 39-45.
60. Круподерова Т.А., Барштейн В.Ю., Рыбалко С.Л. Противовирусная активность мицелия базидиальных грибов в отношении вируса гриппа в экспериментах *in vitro* // Успехи медицинской микологии. – 2014. Т. 12. – С. 312-314.
61. Кудрявцева О. А., Мажейка И. С., Соловченко А. Е, Камзолкина О. В. Генетическая нестабильность короткоживущего аскомицетного гриба *Podospora anserina*, индуцируемая в процессе продолжительного глубинного культивирования // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 6. – С. 772–786.
62. Кузнецова О.Ю. Современные аспекты развития бионано- и/или нанобиотехнологии // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т.16. – №3. – С. 156-163.
63. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
64. Латыпова Г.М., Романова З.Р., Бубенчикова В.Н., Аюпова Г.В. Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного // Химия растительного сырья. – 2009. – №4. – С. 113–116.
65. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 47-52.
66. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А., Бондарев В.П. Оценка токсичности неспецифических медицинских противовирусных средств, предназначенных для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекций // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – №3-4. – С. 11-14.
67. Магин Д.В., Измайлов Д.Ю., Попов И.Н., Левин Г., Владимиров Ю.А. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование // Вопросы медицинской химии. 2000. – Т. 4. – С. 65–68.
68. Макаревич Е.В., Ибрагимова Ж.Б., Теплякова Т.В., Мазурков О.Ю., Бардашева А.В., Мазуркова Н.А. // Исследования вируснейтрализующих свойств экстрактов высших грибов группы порядков гастеромицеты *in vitro* в отношении вируса гриппа А // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №2. – С. 126-127.

69. Матасова С.А., Рыжова Г.Л., Дычко К.А. Химический состав сухого водного экстракта из шрота шиповника // Химия растительного сырья. – 1997. – №2. – С. 28-31.
70. Матвеев Е.В., Величко Н.А., Ушанов С.В., Аешина Е.Н. Определение зависимости коэффициента диффузии и выхода экстрактивных веществ при экстракции древесной зелени *Juniperus sibirica* Бургад этиловым спиртом различной концентрации // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2014. – №6. – С. 260-263.
71. Методы экспериментальной микологии: справочник / В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.
72. Моссэ И.Б., Жаворонков Л.П., Молофёв В.П., Измestьева О.С., Посадская В.М., Измestьев В.И. Разработка на основе меланина средства профилактики генетических и онтогенетических последствий облучения // Вестник ВОГиС. – 2005. – Т. 9. – № 4.
73. Никитина А.С., Попова О.И. Исследование тритерпеновых соединений иссопа лекарственного, культивируемого в условиях ставропольского края // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11 (часть 2). – С. 430-432.
74. Оленников Д.Н., Потанина О.Г., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г. Фармакогностическая характеристика листьев какалии копьевидной // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 43-52.
75. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // Химия растительного сырья. – 2006. – №4. – С. 29–33.
76. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Приложение 2. – С. 118–119.
77. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г. Разработка технологии получения сухого экстракта какалии копьевидной // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 53–58.
78. Ооржак У.С., Ушанова В.М., Репях С.М. Исследование влияния технологических факторов на процесс извлечения экстрактивных веществ из листовенной губки // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 69-72.
79. Пенджиев Э.Д. Энергоэффективный способ СВЧ-экстракции БАВ из растительного сырья. Мат-лы V Всероссийской научной конференции “Химия и технология растительных веществ” – Уфа, 2008. – С. 230.
80. Петров К.А., Чепалов В.А., Софронова В.Е., Перк А.А., Исаев А.П., Седалищев В.Т. Каротиноиды и кормовая ценность *Equisetum variegatum* (хвоща пестрого), произрастающего на полюсе холода // Вестник ЯГУ. – 2007. – Т. 4. – №4.
81. Правдивцева О.Е., Куркин В.А. Сравнительное исследование химического состава надземной части некоторых видов рода *Hypericum* L. // Химия растительного сырья. – 2009. – №1. – С. 79–82.
82. Промышленная технология лекарств: учебник Т.1 / В.И. Чуешов. – Х.: Изд-во НФАУ МТК, 2002. – 560 с.
83. Промышленная технология лекарств: учебник Т.2 / В.И. Чуешов. – Х.: Изд-во НФАУ МТК-Книга, 2002. — 716 с.

84. Пучкова Т.А., Филимонова Т.В., Бабицкая В.Г., Никитина В.Е., Цивилева О.М., Щерба В.В., Иконникова Н.В. Меланиновые пигменты грибов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*, в «Успехи медицинской микологии» под общ. ред. Сергеева Ю.В. Материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии. Москва, 2007. – Т. 9. – С. 17-20.
85. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
86. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: справочник / Р.У. Хабриев – 2-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 2005. – 832 с.
87. Рыбалка В. Б., Горовой Л. Ф., Косяков В. Н., Сенюк О. Ф. Возможности хитиновых биосорбентов в решении технологических проблем очистки жидких радиоактивных отходов // Наукові праці. – 2009. – Т 116. – С. 101-107.
88. Рязанова Т. В., Тюлькова Ю. А. Характеристические параметры процесса экстракции коры сосны водно-щелочным раствором // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С. 49-52.
89. Саенко А.Ю., Маршалкин М.Ф., Гаврилин М.В., Куль И.Я. Использование физико-химических методов для определения содержания флавоноидов в траве овса посевного // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 1.
90. Сафонова М.Ю.Спектрофотометрический метод определения полисахаридов в слоевищах *Cetraria islandica* // Растительные ресурсы. – 1999. – С.101-105.
91. Семенов, С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: справочник / С.М. Семенов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
92. Соломко Э.Ф., Аре Р.Ю., Стеганцева Е.М. Продуктивность базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer при глубинном культивировании на комплексных средах // Биотехнология. – 1988. – Т.4. – №5. – С. 629-633.
93. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье А.с. 1507394 СССР / Беликов В.В., Колесник Н.Т.; заявл. 25.08.87; опубл. 15.09.89, Бюл. 34. – 3 с: ил.
94. Способ микробиологического синтеза секретируемого соматотропина человека и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент секретируемого соматотропина человека: пат. 2460795 Рос. Федерация: МПК С 12 N 15/18, С 12 N 15/81, С 12 Р 21/02, С 12 N1/19, С 12 R 1/865 / Казаченко К.Ю., Козлов Д.Г., Ездаков И.Н., Губайдуллин И.И., Глазунов А.В., Чеперегин С.Э., Ефремов Б.Д.; заявитель и патентообладатель Москва, ин-т генетики и селекции промышленных микроорганизмов. – № 2011127647/10; заявл. 06.07.2011; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 25. – 12 с: ил.
95. Способ определения количества β-каротина в белок содержащих продуктах А. с. 1730578 СССР / Кудинова С.П., Казарян Р.В., Ремизова Е.Б., Кунщикова И.С.; – заявл. 03.05.1989; опубл. 30.04.1992, Бюл. № 16. – 4 с: ил.
96. Способ получения средства, обладающего противоопухолевой активностью, и средство, обладающее противоопухолевой активностью пат. 2418062 Рос. Федерация: МПК С 12 N 1/14, А 61 К 36/07 / Краснопольская Л.М., Автономова А.В., Бухман В.М., Леонтьева М.И.,

- Соболева Н.Ю.; заявитель и патентообладатель Москва, завод экологической техники и экопитания «Диод». – № 2009148354/10; заявл. 25.12.2009; опубл. 10.05.2011.
97. Способ получения хитинсодержащего материала: пат. 2073015 Рос. Федерация: МПК С 08 В 37/08 / Горовой Л.Ф., Косяков В.Н., заявитель и патентообладатель Воронеж, науч. – исслед. ин-т связи. – № 2000131736/09; заявл. 11.10.1991; опубл. 10.02.1997. – 10 с: ил.
 98. Способ получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел пат. 2382051 Рос. Федерация: МПК С 08 В 37/00 / Селионова М.И., Погарская Н.В.; заявитель и патентообладатель Ставрополь, науч. - исслед. ин-т животноводства и кормопроизводства. – № 2008129931/13; заявл. 21.07.2008; опубл. 20.02.2010, Бюл. № 5. – 14 с: ил.
 99. Сурсякова В.В., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И., Разработка методик определения фенолов в питьевой и природной водах методами капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: химия. – 2010. – Т. 3. – №3. – С. 268-277.
 100. Сушинская Н.В., Курченко В.П. Меланины трутовых грибов // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2006. – Вып. 1. – С. 143-154.
 101. Тезекбаева Б.К., Ахметжанова А.Б., Малахова Н.П. Введение в культуру *in vitro* трех сортов масличного льна // Интеллектуальный потенциал XXI века: Ступени познания. – 2014. – №25. – С. 16-20.
 102. Тищенко, Е.В. Разработка технологии глубинного культивирования гриба *Trichophyton verrucosum*: автореф. дис... канд. биол. наук / Тищенко Е.В. – Москва: МГАВМиБ им. Скрыбина 2010. - 21 с.
 103. Ткачев, А.В. Исследование летучих веществ растений: монография / А.В. Ткачев. – Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2008. – 972 с.
 104. Унифицированный способ количественного определения флавоноидов в траве и экстракционных препаратах очанки пат. 2266544 Рос. Федерация: МПК G 01 N 33/52 / Петриченко В.М., Сухинина Т.В.; заявитель и патентообладатель Пермь, Пермская государственная фармацевтическая академия. – № 2003137328/15; заявл. 24.12.2003; опубл. 20.12.2005.
 105. Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 123–127.
 106. Федосеева Л.М., Малолеткина Т.С. Изучение и сравнительная оценка липофильных веществ зеленых, красных и черных листьев бадана толстолистного, произрастающего на алтае // Химия растительного сырья. – 1999. – №2. – С. 113–117.
 107. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 63-75.
 108. Царенко Н.А. Фенольные соединения плодов некоторых видов *Padus* и *Cerasus* (Rosaceae) // Вестник Красноярского Государственного аграрного университета. – 2010. – №3. – С. 49-57.
 109. Цыдендамбаев П.Б., Хышиктуев Б.С., Николаев С.М. Биологические эффекты флавоноидов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – Вып. 6. – №52.

110. Чай. Методы определения содержания танина и кофеина: ГОСТ СССР 19885-1974. – Введ. 1975-07-01. – М.: Изд-во стандартов, 1974. – 5 с.: ил.
111. Чайка А.В., Федотов О.В. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов ксилотрофных базидиомицетов в глубинной культуре // Биологический вестник мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана хмельницкого. – 2013. – Вып.2. – №8. – С. 220-236.
112. Чхенкели В.А., Чхенкели Л.Г. Основы технологии получения продуктов биотехнологии методом жидкофазной ферментации базидиального гриба *Trametes pubescens* (Shumach.) Pilat // Вестник ИрГСХА. – Вып. 33. – 2009. – С. 49-58.
113. Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65–68.
114. Штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты (варианты) и способ получения аминокислот (варианты) пат. 2212447 Рос. Федерация: МПК С 12 N 1/21, С 12 Р 13/04, С 12 N 1/21, С 12 R 1/19 / Лившиц В.А., Дорошенко В.Г., Машко С.В., Ахвердян В.З., Козлов Ю.И.; заявитель и патентообладатель Москва, науч. – исслед. Ин-т Аджиномото-Генетика. – №2000110350/13; заявл. 26.04.2000; опубл. 20.09.2003.
115. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса Алма-Атинская 21л-терморезистентный продуцент ферментов протеазного и амилазного комплекса декарбоксилазы, витамина В-12, аминокислот и сахаров, используемый для производства хлеба на жидких дрожжах А.с. № 707964 Казахстан: МПК С 12 N 1/18 / Латфуллина Р.Ш.; – заявл. 09.09.1993; опубл. 15.03.1995, Бюл. № 1. – 7 с: ил.
116. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / З.П. Софьина, А.М. Голдин. – М.: Медицина, 1980.
117. Юдина Н. В., Иванов А. А., Лоскутова Ю. В., Писарева С. И., Буркова В. Н. Влияние параметров диспергирования крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) на изменения степени измельчения, выходов и свойств экстрактивных веществ // Химия растительного сырья. – 2012. – №1. – С. 137-142.
118. Abella A., Messaoudi C., Laurent D., Marot D., Chalas J., Breux J., Claise C., Lindenbaum A. A method for simultaneous determination of plasma and erythrocyte antioxidant status. Evaluation of the antioxidant activity of vitamin E in healthy volunteers // British Journal of Clinical Pharmacology. – 1996. – V. 42. – P. 737–741.
119. Akihisa T., Uchiyama E., Kikuchi T., Tokuda H., Suzuki T., Kimura Y. Anti-tumor-promoting effects of 25-methoxyporicoic acid A and other triterpene acids from *Poria cocos* // J Nat Prod. – 2009. – V. 72. – N. 10. – P. 1786-92.
120. Ali N.A.A., Jansen R., Pilgrim. H., Liberra K., Lindequist U. Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus* // Phytochemistry. – 1996. – V. 42. – P. 927-929.
121. Bendiabdellah A., Dib M., Meliani N., Djabou N., Allali H., Tabti B. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2012. – V.02. – №07. – P. 92-95.
122. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // Analytical Biochemistry. 1996. – V. 239. – P. 70–76.

123. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* – 1976 – №72. – C. 248-254.
124. Cao G. H., Alessio H. M. Cutler R. G. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants // *Free Radicals In Biology And Medicine.* – 1993. – V. 3. – №14. – P. 303–311.
125. Chen W., Zhao Z., Li Y. Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention // *Carbohydrate Polymers.* – 2011. – V.85. – P. 369–375.
126. Chena W., Zhao Z., Chena S., Li Y. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro* // *Bioresource Technology.* – 2008. – V. 99. – №8 – 2008. – P. 3187-3194.
127. Cheung L.M., Cheung P.C.K. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. // *Food Chemistry.* – 2005. – V. 89. – P. 403-409.
128. Chirinang P. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajorcaju* // P. Chirinang, K.-O. Intarapichet // *Science Asia.* – 2009. – V. 35. – P. 326-331.
129. Collins R.A., Ng T.B. Polysaccaro-peptide from *Trametes versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection // *Life Science.* – 1997. – V. 60. – №25. – P. 383-387.
130. Cyranka M., Graz M., Kaczor J., Kandefer-Szerszen M., Walczak K., Kapka-Skrzypczak L., Rzeski W. Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) *in vitro* grown mycelium // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2011. – 13. – №6. – P. 525-533.
131. Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Johnston D. Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients // *Life Sciences.* 1997. V. 60. P. 335–340.
132. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* – 1956. – V. 28. – P. 350-356.
133. Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2001. – V. 49. – P. 2222–2227.
134. El Dine R.S, El Halawany A.M., Ma C.M., Hattori M. Anti-HIV-1 protease activity of lanostane triterpenes from the vietnamese mushroom *Ganoderma colossum* // *J. Nat. Prod.* – 2008. – V. 71. – №6. – P. 1022-1026.
135. El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattory M., Kakiuci N. Anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum* // *Phytochemistry.* – 1998. – V. 49. – P. 1651-1657.
136. Faccin L., Benati F, Rincro V., Mantovani M., Soares S., Gonzaga M., Nozawa C., Carvalho Linhares R.. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1 // *Lett Appl Microbiol.* – 2007. – V. 45. – №1. – P. 24-28.

137. Fan L., Pan H., Soccol A.T., Pandey A., Soccol C.R. Advances in Mushroom Research in the Last Decade // Food Technol. Biotechnol. – 2006. – V. 44 – №3. – P. 303-311.
138. Gao Y., Lin Z., Huang M., Zhou S. Hepatoprotective activity and the mechanisms of action of *Ganoderma lucidum* P. Karst. // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2003. – V. 5. – №2. – P. 111-131.
139. Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. A fluorescence- based method for measuring total plasma antioxidant capability // Free Radicals In Biology And Medicine. – 1995. – V. 18. – P. 29–36.
140. Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis // The International Agency for Research on Cancer Organization, World Health, Press release N 224, Lyon/London. – 2014.
141. Gu C., Li J., Chao F., Jin M., Wang X., Shen Z. Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa* // Antiviral Research. – 2007. – V. 75. – №3. – P. 250-257.
142. Gu C., Li J., Chao FH. Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: synergistic effect of combination with interferon-alpha in HepG2 2.2.15 // Antiviral Res. – 2006. – V. 72. – №2. – P. 162-165.
143. Hu D.D., Zhang R.Y., Zhang G.Q., Wang H.X., Ng T.B. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea* // Phytomedicine. – 2011. – V. 18. – P. 374-379.
144. Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53. – P. 1841-1856.
145. Huck C.W., Huber C.G., Ongania K.H., Bonn G.K. Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry // Journal of chromatography. – 2000. – V. 870(1–2). – №6. – P. 453.
146. Ichimura T., Watanabe O., Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. Biosci Biotechnol Biochem. – 1998. – V. 62. – P. 575-577.
147. Ikekawa T., Nakanishi M., Uehara N., Chihara G., Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus* // Jap. J. Canc. Res. – 1968. – №59. – P. 155-157.
148. Kamo T., Asanoma M., Shibata H., Hirota M. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus* // J. Nat. Prod. – 2003. – 66. – №8. – P. 1104-1106.
149. Kampa M., Nistikaki A., Tsaousis V., Maliaraki N., Notas G., Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay // BMC Clinical Pathology. 2002. V. 2.
150. Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Prajuabsuk T., Soyong K., Kongsaree P., Suksamrarn A. A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum* // Planta Med. – 2003. – V. 69. – №6. – P. 568-571.

151. Kawagishi H., Nomura A., Mizuno T., Kimura A., Chiba S. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1990. – №3. – C. 247-252.
152. Khushbaktova Z. A., Yusupova S. M., Badal'yants K. L., Syrov V. N., Batirov E. Kh. Isolation of hispidin from a walnut-tree fungus and its antioxidant activity // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1996. – V. 32. – I. 1. – P. 27-29.
153. Kim E., Jung H., Min T. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. Structure, Biological Activity Substance in *D. tricolor* Bull. Korean Chem. Soc. – 2001. – V. 22. – №1.
154. Kodama N., Kakuno T., Nanba H. Stimulation of the natural immune system in normal mice by polysaccharide from maitake mushroom // *Mycoscience*. – 2003. – V. 44. – P. 257-261.
155. Krasovska A., Rosiak D., Czkapiak K., Lukaszewicz M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds // *Current topics in Biophysics*. – 2000. – V. 24. – P. 89-95.
156. Krawczyk E., Luczak M., Majewska A. Antiviral and cytotoxic activities of new derivatives of natural sesquiterpenes and taxol // *Med Dosw Mikrobiol*. – V. 2005. – 57. – №1. – P. 93-99.
157. Kumari M., Survase S.A., Singhal R.S. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – P. 1036-1043.
158. Lee I., Yun B. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance // *J Antibiot*. – 2011. – V. 64. – №5. – P. 349-59.
159. Lee J. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats // *Nutrition Research*. – 2005. – V. 25, №2 – P. 187-195.
160. Lee S., Park S., Oh J. W., Yang C. Structures Natural inhibitors for protein prenyltransferase // *Planta Medica*. – 1998. – №4. – C. 303-308.
161. Lehmann V.K, Huang A, Ibanez-Calero S, Wilson GR, Rinehart KL. Illudin S, the sole antiviral compound in mature fruiting bodies of *Omphalotus illudens* // *J Nat Prod*. – 2003. – V. 66. – № 9. – P. 1257-1258.
162. Li C., Li Y., Sun H. H. New ganoderic acids, bioactive triterpenoid metabolites from the mushroom *Ganoderma lucidum* // *Natural Product Research*. – 2006. – № 11. – C. 985-991.
163. Li L. Antioxidant activity with content of phenolics in extracts from the culinary-medicinal abalone mushroom *Pleurotus abalones*, Chen et Chang / L. Li, T.B. Ng, I. Zhao // *International Journal of Medicine Mushrooms*. – 2005. – V. 28. – P. 237-242.
164. Li M, Zhang G, Wang H, Ng T. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum* // *J Microbiol Biotechnol*. – 2010. – V. 20. – №7. – P. 1069-1076.
165. Li Y., Liu Q., Wang H., Ng T. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus* // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – V. 1780. – №1. – P. 51-57.

- 166.Li Y., Wang S. Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* // Biotechnol Lett. – 2006 . – №11. – P. 837-841.
- 167.Lin J. Y., and Chou, T. B. Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea* // The Biochemical journal. – 1984. – №96. – C. 35-40.
- 168.Lina S.B., Li C.H., Lee S.S., Kand L.S. The Pharmacological Potential of Mushrooms // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2005. – №3. – P. 285-299.
- 169.Lina S.B., Li C.H., Lee S.S., Kand L.S. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest // Life Sciences . – 2003. – № 72. – C. 2381-2390.
- 170.Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. D. The Pharmacological Potential of Mushrooms // eCAM. 2005. – V. 2. – №3. – P. 285-299.
- 171.Lo K.M., Cheuhg P. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. // Food Chemistry. – 2005. – V. 89. – P. 533-539.
- 172.Lowry O.H., Rosebroug H.N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // The Journal of Biological Chemistry. – 1952. – V. 193. – P. 265-275.
- 173.Lussignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G., Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma // Analytical Biochemistry. – 1999. – № 269. – P. 38–44.
- 174.Lv H., Kong Y., Yao Q., Zhang B., Leng F., Bian H., Balzarini J., Van Damme E., Bao J. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects // Phytomedicine. – 2009. – V. 16. – №2-3. – P. 198-205.
- 175.Mahy B.W.J., Kangro H.O. Virology methods manual. Edited by Mahy B.W.J., Kangro H.O. // London: Academic Press. – 1996. – 374 p.
- 176.Mayell M., Maitake extracts and their therapeutic potential // Altern. Med. Rev. – 2001. – V. 6. – №1. – P. 48-60.
- 177.Mothana R., Awadh N., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES. // Fitoterapia. – 2003. – V. 74. – P. 177–180.
- 178.Nguyen T., Chen J., Hu Y., Wang D., Fan Y., Wang J., Abula S., Zhang J., Qin T., Chen X., Chen X., Khakame S., Dang B. *In vitro* antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides // Carbohydr Polym. – 2012. – V. 90. – № 3. – P. 1254-1258.
- 179.Nianwu H.E. Vitro Activity Study of the Wild *Daedaleopsis Tricolor* Polysaccharide // Editorial Department of Journal of Shangluo University. – 2012. – I. 6. – P. 55-59.
- 180.Nomura M., Takahashi T., Uesugi A, Tanaka R., Kobayashi S. Inotodiol, a Lanostane Triterpenoid, from *Inonotus obliquus* Inhibits Cell Proliferation through Caspase-3-dependent Apoptosis // Anticancer research. – 2008. – №28. – C. 2691-2696.
- 181.Nukata M., Hashimoto T., Yamamoto I., Iwasaki N., Tanaka M., Asakawa Y., Neogrifolin derivatives possessing anti-oxidative activity from the mushroom *Albatrellus ovinus* // Phytochemistry. – 2002. – V. 59. – №7. P. – 731-737.

- 182.Ohtsuka S., Ueno S., Yoshikumi C., Hirose F., Ohmura Y., Wada T., Fujii T., Takahashi E. Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. UK Patent 1331513. – 1973.
- 183.Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // Jpn. J. Nutr. – 1986. – Vol. 44. – P. 307–315.
- 184.Park Y.M., Kim I.T., Park H.J., Choi J.W., Park K.Y., Lee J.D Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*.// Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004. – V. 27. – №10 – P. 1588 – 1593.
- 185.Piraino F., Brandt C.R. Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata* // Antiviral Research. – 1999. – V. 43 – P. 67–78.
- 186.Possible mode of action of *Ganoderma lucidum* *in vitro* // Liu J. [et al] // Journal of Ethnopharmacology. – 2004. – V. 95. – P. 265-272.
- 187.Razumov I.A., Kosogova T.A., Kazachinskaja E.I., Puchkova L.I., Shcherbakova N.S., Gorbunova I.A., Mikhailovskaia I.N., Loktev V.B., Tepliakova T.V. Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi // Antibiot Khimioter. – 2010. – V.55. – №9-10. – P. 14-8.
- 188.Rincao V., Yamamoto K., Ricardo N., Soares S., Meirelles L., Nozawa C., Linhares RE. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity // Virol J. – 2012. – V. 9. – P. 37.
- 189.Ritz B., Nogusa S., Ackerman E., Gardner E. Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection // J Nutr. – 2006. – V. 136. – №11. – P. 2868-2873.
- 190.Robles-Hernandez L., Cecilia-Gonzalez-Franco A., Soto-Parra J.M., Montes-Dominguez F. Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms// Tecnociencia Chihuahua. – 2008. – V. 2. – № 2.
- 191.Sato N., Zhang Q., Ma C., Hattori M. Anti-human immunodeficiency virus-1 protease activity of new lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma sinense* // Chem. Pharm. Bull (Tokyo) . – 2009. – V. 57. – №10. – P. 1076-1080.
- 192.Schleisier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods // Free Radic. Res. – 2002. – V. 36. – P. 177-187.
- 193.Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V., Savichuk H.O., Rytik P.G., Kuchеров I.I., Prilutskay A.B., Prilutsky A.I. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Aphyllphoromycetideae) // Int. J. Med. Mushrooms. – 2011. – V. 13. – №1. – P. 7-18.
- 194.Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples // Drug Metabolism Reviews. – 2000. – V. 32. – №3-4. – P. 307–326.
- 195.Simon B., Anke T., Sterner O. Hydroxylated unsaturated fatty acid from cultures of a *Filoboletus* species // Phytochemistry. – 1994. – №3. – P. 815 – 816.

- 196.Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*. – 1999. – V. 299. – P. 152–178.
- 197.Srinivasan P., Vadhanam M.V., Arif J.M., Gupta R.C. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents *in vitro* // *International Journal of Oncology*. – 2002. – V. 20. – P. 983–986.
- 198.Stamets P. *MycoMedicinals* / P. Stamets // *An Informational Yreatise on Mushrooms*: Printed in China, 2002. – 96 p.
- 199.Stephanson C.J., Stephanson A.M., Flanagan G.P. Antioxidant capability and efficacy of Mega-H silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by *in vitro* cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection // *Journal of Medicinal Food*. – 2002. – №5. – P. 9-16.
- 200.Sulkowska-Ziaja K., Muszynska B., Motyl P., Pasko P., Ekiert H. Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland // *Int J Med Mushrooms*. 2012. – V. 14. – №4. – P. 385-933.
- 201.Sun J., Wang H., Ng T.. Isolation of a laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from fresh fruiting bodies of the *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) // *Indian J Biochem Biophys*. – 2011. – V. 48. – №2. – P. 88-94.
- 202.Suzuki H., Okubo A., Yamazaki S., Suzuki K., Mitsuya H., Toda S. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1989. – V. 160. – P. 367–373.
- 203.Suzuki T, Sugiyama K, Hirai H, Ito H, Morita T, Dohra H, Murata T, Usui T, Tateno H, Hirabayashi J, Kobayashi Y, Kawagishi H. Mannose-specific lectin from the mushroom *Hygrophorus russula* // *Glycobiology*. – 2012. – V. 22 – №5. – P. 616-629.
- 204.Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A. Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2012. – V. 14. – № 1. – P. 37-45.
- 205.Thyagarajan A., Jedinak A., Nguyen H., Terry C., Baldridge L. A., Jiang J., Sliva D. Triterpenes From *Ganoderma Lucidum* Induce Autophagy in Colon Cancer Through the Inhibition of p38 Mitogen-Activated Kinase (p38 MAPK) // *Nutrition and Cancer*. – 2010. – №5. – C. 630-640.
- 206.Tochikura T., Nakashima H, Ohashi Y, Yamamoto N. Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia // *Med. Microbiol. Immunol*. – 1988. – V. 177. – №5. – P. 235-244.
- 207.Tomasi S. Loherzic-Le Derverhat F., Sauleau P., Berzivin C., Boustie J. Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines // *Pharmazie*. – – V. – №– P.
- 208.Tubaro F., Ghiselli A., Rapuzzi P., Maiorino M., Ursini F.: Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics // *Free Radicals in Biology and Medicine*. – 1998. – V. 24. – P. 1228–1234.

209. Vidovic S., Zekovic Z., Mujić I., Lepojevic Z., Radojkovic M., Zivkovic J. The antioxidant properties of polypore mushroom *Daedaleopsis confragosa* // Cent. Eur. J. Biol. – 2011. – №6 (4) – P. 575-582.
210. Wang C., Ng T., Li L., Fang J., Jiang Y., Wen T., Qiao W., Li N., Liu F. Isolation of a polysaccharide with antiproliferative, hypoglycemic, antioxidant and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the fruiting bodies of the abalone mushroom *Pleurotus abalonus* // J. Pharm. Pharmacol. – 2011. – V. 63. – №6. – P. 825-832.
211. Wang H., Ng T. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidium* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 72. – №3. – P. 508-513.
212. Wang H., Ng T. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. Life Sci. – 2001 – V. 68. – №18. – P. 2151-2158.
213. Wang H.X., Ng T.B. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities // Biochem Biophys Res. Commun. – 2000. – V. 256. – P. 587-593.
214. Wang H.X., Ng T.B., Ooi V. E. C., Liu W. K., Chang, S. T. Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, splenocytes and life-span in sarcoma-bearing mice // Anticancer Research. – 1997. – №17. – C. 419-424.
215. Wang S., Welte T., Fang H. Oral administration of active hexose correlated compound enhances host resistance to West Nile encephalitis in mice // Journal of Nutrition. – 2009 – V. 139 №3. – P. 598-602.
216. Wang Y., Cheng X., Wang P., Wang L., Fan J., Wang X., Liu Q. Investigating migration inhibition and apoptotic effects of *Fomitopsis pinicola* chloroform extract on human colorectal cancer SW-480 cells // PLoS One. – 2014. – V. 9. – №7.
217. Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Microbiol Biotechnol. – 2002. – V. 60. – №3. – P. 258-274.
218. Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 89. – P. 1323-1332.
219. Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins // FEBS Letters. – 1985. – V. 187. – P. 33-37.
220. Wong J., Ng T., Jiang Y., Liu F., Sze S., Zhang K. Purification and characterization of a Laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*) // Protein Pept Lett. – 2010. – V. 17. – №8. – P. 1040-1047.
221. Wong J., Wang H., Ng T. Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Hypsizygus marmoreus* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2008. – V. 81. – №4. – P. 669-674.
222. Wu Y., Wang H., Ng T. A novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom *Lepista nuda* // J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 21. – №3. – P. 256-62.

223. Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X. Bioactive proteins from mushrooms // *Biotechnol Adv.* – 2011. – V. 29. – N. 6. – P. 667-674.
224. Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials // *Analytical Sciences (Japan).* – 2001. – V. 17. – P. 599–604.
225. Yang J., Lin H., Mau J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms // *Food Chemistry.* – 2002. – V. 77. – P. 229-235.
226. Yang X.F., Guo X.Q. Fe(II)-EDTA Chelate-Induced Aromatic Hydroxylation of Terephthalate as a New Method for the Evaluation of Hydroxyl Radical-Scavenging Ability // *The Analyst.* – 2001. – №126. – P. 928–932.
227. Yu L.G., Fernig D.J., Smith J.A., Milton J.D., Rhodes J.M. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin // *Cancer Research.* – 1993. – №53. – C. 4627-4632.
228. Zhao J.Y., Feng T., Li Z.H., Dong Z.J., Zhang H.B., Liu J.K. Sesquiterpenoids and an ergosterol from cultures of the fungus *Daedaleopsis tricolor* // *Nat. Prod. Bioprospect.* – 2013. – V. 3. – P. 271–276.
229. Zhao Y., Zhang G., Ng T., Wang H. A novel ribonuclease with potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from cultured mushroom *Schizophyllum commune* // *J Microbiol.* – 2011. – V.49. – №5. – P. 803-808.
230. Zheng W. Phenolic compounds from *Inonotus obliquus* and their immune-stimulating effects/ W. Zheng, Y. Z Yao, M. Zheng, Z.Yin, C. Chen, Z. Wei // *Mycosystema.* – 2008. – V. 27 – №4. – P. 574-581.
231. Zhong C., Wang R., Zhou Z., Jia S.R., Tan Z.L., Han P.P. Functional properties of protein isolates from *Caragana korshinskii* Kom. extracted by three different methods // *J. Agric. Food Chem.* – 2012. – V.60. – №41 – P.10337-10342.
232. Zhu M., Chang Q., Wong L. K., Chong F.S., Li R.C. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum* // *Phytotherapy Research.* – 1999. – № 13. – C. 529-531.
233. Zjawiony J. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi // *J. Nat. Prod.* – 2004. – V. 67 – №2. – P. 300-310.
234. Zou Y., Wang H., Ng T., Huang C., Zhang J. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Hericium coralloides* // *J. Microbiol.* – 2012. – V. 50. – № 1. – P. 72-78.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 Стандартные операционные процедуры

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Подразделение: Отдел профилактики и лечения особо опасных инфекций, Лаборатория разработки препаратов грибоного происхождения, Сектор биохимии

Страница 1 из 5

СОП № 3-032/01-13

Название: Определение концентрации флавоноидов методом комплексообразования с хлоридом алюминия

Пересмотр: Новая

Составлена: Старший научный сотрудник Н.Е. Костиня	Рассмотрена: Зав. сектором биохимии Г.Н. Трошкова	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.Н. Агафонов	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Шулаева Л.В.
« 25 » 03 2013 г.	« 25 » 03 2013 г.	« 25 » 03 2013 г.	« 25 » 03 2013 г.
Младший научный сотрудник М.А. Проценко			
« 03 » 04 2013 г.	« 03 » 04 2013 г.	« 04 » 07 2013 г.	« 03 » 04 2013 г.

1. Введение, цель

Настоящая стандартная операционная процедура (СОП) устанавливает порядок проведения операций при определении концентрации флавоноидов методом комплексообразования с хлоридом алюминия.

2. Область применения

Данная СОП регламентирует порядок проведения операций при определении концентрации флавоноидов, также СОП используется для обучения персонала.

3. Термины и обозначения

СОП – стандартная операционная процедура.

4. Пересмотр

Данная СОП разработана впервые.

5. Помещения






Работы по определению флавоноидов методом комплексообразования с хлоридом алюминия проводятся в помещении № 303 лаборатории сектора биохимии отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций корпуса № 5.

6. Материалы и оборудование

Таблица 1.

Наименование сырья, реактивов и материалов	НТД, страна, фирма
Алюминия хлорид	Диазм, Россия
Дигидроацетатин ГСО	ТУ 2638-017-80884467-10 «Фитопанacea», Россия
Лютеолин-7-глюкозид ГСО	ТУ 2638-014-80884467-10 «Фитопанacea», Россия
Натрия ацетат	ГОСТ 2080-76; ГОСТ 199-78
Рутин ГСО	ТУ 2638-011-80884467-10

Документ конфиденциальный и без подписей недействителен

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»			
Подразделение: Отдел профилактики и лечения особо опасных инфекций. Лаборатория разработки препаратов грибного происхождения. Сектор биохимии			Страница 1 из 6
СОП № 3-038/01-16			
Название: Анализ антиоксидантной активности в препаратах, выделенных из природных источников			
Пересмотр: вводится впервые			
Составлена: Младший научный сотрудник М.А. Проценко  «19» 01.2016 г.	Рассмотрена: Зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций Л.Н. Шишкина  «21» 01.2016 г.	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П. Агафонов  «08» 02.2016 г.	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н. Стрельцова  «22» 01.2016 г.
Старший научный сотрудник Н.Е. Костина  «19» 01.2016 г.			

1. Введение, цель

Настоящая стандартная операционная процедура (СОП) устанавливает порядок проведения операций при анализе антиоксидантной активности в образцах, полученных из грибного и растительного сырья.

2. Область применения

Фотоколориметрический метод анализа антиоксидантной активности используют для оценки интенсивности торможения накопления продуктов перекисного окисления полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата препаратами грибного и растительного происхождения.

3. Термины и обозначения

СОП – стандартная операционная процедура.

4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.





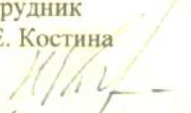
5. Помещения

Работы по анализу антиоксидантной активности проводятся в помещении № 303 сектора биохимии отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций корпуса № 5.

6. Материалы и оборудование

Таблица 1.

Наименование сырья, реактивов и материалов	НТД, страна, производитель
2-тиобарбитуровая кислота, чда	«Реактив», Россия
Аскорбиновая кислота	ГФ XII, ФС 42-0218-07, с. 506
Вода дистиллированная, рН от 5,0 до 7,0	ГОСТ 6709-72
Дигидрокверцетин ГСО	ТУ 2638-017-80884467-10 «Фитопанацея»,

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»			
Подразделение: Отдел профилактики и лечения особо опасных инфекций. Лаборатория разработки препаратов грибного происхождения. Сектор биохимии.			Страница 1 из 4
СОП № 3-039/01-16			
Название: Получение сухого спиртового извлечения из грибного сырья			
Пересмотр: вводится впервые			
Составлена: Младший научный сотрудник М.А. Проценко  «19» 01 2016 г.	Рассмотрена: Зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций Л.Н. Шишкина  «21» 01 2016 г.	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П. Агафонов  «08» 02 2016 г.	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н. Стрельцова  «22» 01 2016 г.
Старший научный сотрудник Н.Е. Костина  «19» 01 2016 г.			

1. Введение, цель

Настоящая стандартная операционная процедура (СОП) устанавливает порядок проведения операций при приготовлении сухого спиртового извлечения из грибного сырья.

2. Область применения

Метод дробной экстракции используется для массопереноса биологически активных веществ из природного сырья в экстрагент.

3. Термины и обозначения

СОП – стандартная операционная процедура.

Грибное сырье – высшие грибы природного и биотехнологического происхождения.

4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.






5. Помещения

Проведение работ осуществляется в пом. № 303 лаборатории сектора биохимии отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций корпуса 5.

6. Материалы и оборудование

Таблица 1.

Наименование сырья, реактивов и материалов	НТД, страна, производитель
Средство моющее жидкое «Прогресс»	ТУ 2383-018-52662802-2002
Ерш для мытья посуды	ГОСТ 28638-90
Вода дистиллированная, рН от 5,0 до 7,0	ГОСТ 6709-72
Спирт этиловый ректификат технический	ГОСТ 18300-87

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»			
Подразделение: Отдел профилактики и лечения особо опасных инфекций. Лаборатория разработки препаратов грибного происхождения. Сектор биохимии			Страница 1 из 6
СОП № 3-040/01-16			
Название: Определение концентрации фенольных соединений в препаратах, выделенных из природных источников			
Пересмотр: вводится впервые			
Составлена: Младший научный сотрудник М.А. Проценко  «19» 01.2016 г.	Рассмотрена: Зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций Л.Н. Шишкина  «21» 01.2016 г.	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П. Агафонов  «08» 02.2016 г.	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н. Стрельцова  «22» 01.2016 г.
Старший научный сотрудник П.Е. Костина  «19» 01.2016 г.			

1. Введение, цель

Настоящая стандартная операционная процедура (СОП) устанавливает порядок проведения операций по определению содержания фенольных соединений в препаратах растительного и грибного происхождения.

2. Область применения

Фотоколориметрический метод Фолина-Чикольте используют для определения содержания фенольных соединений в фитопрепаратах как наиболее чувствительный и специфичный.

3. Термины и обозначения

СОП – стандартная операционная процедура.

4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

5. Помещения

Работы по определению фенольных соединений проводятся в помещении № 303 сектора биохимии корпуса № 5.

6. Материалы и оборудование

Таблица 1.

Наименование сырья, реактивов и материалов	НТД, страна, производитель
Галловая кислота, ХЧ	Диаэм, Россия
Натрий вольфрамвоокислый 2-водн., ЧДА	Реахим, Россия
Натрий молибденовоокислый 2-водн., ЧДА	Красный химик
Ортофосфорная кислота ОСЧ28-5	Компонент-реактив
Соляная кислота концентрированная, ОСЧ	Сигма-тек
Сульфат лития 1-водн., ОСЧ II-3	Редмет

Приложение 2 Справки о депонировании штаммов грибов



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.01.2015 № 02.15/286

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Коллекция бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

Штамм *Daedaleopsis tricolor* Db-18
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Проценко М.А., 630559, р.п. Кольцово Новосибирской обл., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Тел.: +7(383) 336-60-10, Факс: +7(383) 336-74-09

(ФИО, организация, адрес, тел., факс)

Депозитор: 630559, р.п. Кольцово Новосибирской обл., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: F-1314

И.о. генерального директора



(Подпись, МП)

В.Н. Михеев



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.01.2015 № 02.15/285

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Коллекция бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

Штамм *Daedaleopsis tricolor* Db-14

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Проценко М.А., 630559, р.п. Кольцово Новосибирской обл., ФБУН
ГНЦ ВБ «Вектор»
Тел.: +7(383) 336-60-10, Факс: +7(383) 336-74-09

(ФИО, организация, адрес, тел., факс)

Депозитор: 630559, р.п. Кольцово Новосибирской обл., ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор»

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **F-1315**

И.о. генерального директора



(Подпись, МП)

В.Н. Михеев



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09
 E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 21.12.2015 № 02.15/3546

На № _____ от _____

Справка о депонировании
штамма микроорганизма

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Коллекция бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
приняла на депонирование

штамм *Daedaleopsis tricolor Dr-17*

(название вида и штамма микроорганизма)

Вид депонирования: гарантийное хранение

Дата депонирования: 16.12.2015

Авторы штамма: Проценко М.А., Костина Н.Е., 630559, р.п. Кольцово
Новосибирской обл., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»;
Тел.: +7(383) 336-60-10, Факс: +7(383) 336-74-09

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, р.п. Кольцово Новосибирской
обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **F-1330**

И.о.генерального директора



В.Н.Михеев