Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Московский государственный университет пищевых производств

На правах рукописи

Жилинская Наталия Викторовна

ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА БАЗИДИОМИЦЕТОВ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.: FR.) BOND. ET SING., *FOMITOPSIS PINICOLA* (SW.: FR) P. KARST. И *TRAMETES VERSICOLOR* (L.: FR.) LLOYD: ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., проф. Громовых Т.И.

Москва–2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…… 6

ГЛАВА 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНТАМИНАНТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАЗИДИОМИЦЕТОВ ИЗ РОДОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*: ОЦЕНКА ОПЫТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ……. 12

1.1 Характеристика биологических контаминантов пищевой продукции и современных способов борьбы с ними……. 12

1.2 Характеристика ксилотрофных базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes*…… 17

1.2.1 Общая характеристика грибов рода *Fomitopsis*…….. 17

1.2.2 Общая характеристика грибов рода *Trametes*……. 21

1.3 Опыт практического использования высших базидиомицетов как продуцентов биологически активных веществ…… 25

1.3.1 Использование грибов рода *Fomitopsis*……... 29

1.3.2 Использование грибов рода *Trametes*…….. 32

1.4 Культивирование базидиальных грибов, методы стимулирования роста……. 35

1.4.1 Традиционные питательные среды и условия культивирования……..... 36

1.4.2 Исследование физических методов по ускорению роста базидиомицетовых грибов……. 37

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ…… 42

2.1 Характеристика изучаемых штаммов из родов *Fomitopsis* и *Trametes*… 42

2.2 Методы исследования…….. 43

2.2.1 Изучение противомикробной активности метаболитов водных и спиртовых экстрактов мицелия……. 44

2.2.2 Изучение миколитической активности штаммов……... 45

2.2.3 Молекулярно-генетические исследования штаммов……. 46

2.2.4 Изучение морфолого-культуральных особенностей и показателей

роста штаммов на различных питательных средах…… 46
2.2.5 Подбор растительных субстратов для твердофазного культивирования базидиомицетов…….. 49
2.2.6 Изучение динамики накопления биомассы ……..…… 49
2.2.7 Исследование ферментативной активности…… 50
2.2.8 Исследование биохимического состава мицелия штаммов базидиомицетов……. 51
2.2.9 Определение степени переваримости белка…….. 58
2.2.10 Исследование токсичности штаммов на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*…… 60
2.2.11 Оценка влияния физических факторов на ростовые показатели базидиомицетов…….. 63
2.2.12 Изучение свойств препарата мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor*……. 65
2.2.13 Статистическая обработка полученных результатов…….. 73
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*…… 75
3.1 Антибактериальная активность в отношении контаминантов пищевых продуктов……..…….. 75
3.2 Антибиотическая и миколитическая активность в отношении микромицетов рода *Penicillium* ..……. 78
ГЛАВА 4. КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ШТАММОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*……... 83
4.1 Культурально-морфологические особенности штаммов…….. 83
4.2 Молекулярно-генетические свойства штаммов…… 87
4.3 Твердофазное культивирование штаммов на растительных субстратах……...……. 89

4.4 Динамика накопления биомассы при жидкофазном культивировании штаммов…….. 92
4.5 Ферментативная активность штаммов……... 95
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ШТАММОВ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* TYV-2006, *FOMITOPSIS PINICOLA* FP-04/99 И *TRAMETES VERSICOLOR* B 08/06….. 96
5.1 Влияние оптических излучений на показатели роста штаммов……... 96
5.2 Влияние акустических волн на показатели роста штаммов……. 100
ГЛАВА 6. БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* TYV-2006, *FOMITOPSIS PINICOLA* FP-04/99 И *TRAMETES VERSICOLOR* B 08/06…….. 102
6.1 Качественный состав белка мицелия …… 103
6.2 Содержание углеводов и глюканов в мицелии штаммов……..……... 104
6.3 Переваримость белка мицелия штаммов…….……..… 106
6.4 Оценка токсичности мицелия штаммов……. 107
ГЛАВА 7. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИЦЕЛИЯ ШТАММА *TRAMETES VERSICOLOR* B 08/06 В ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ……. 110
7.1 Испытание препарата мицелия для получения колбасной продукции…… 110
7.2 Получение натурального полимерного покрытия с противомикробными компонентами…… 117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……... 127
ВЫВОДЫ…….…… 130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…….. 132
ПРИЛОЖЕНИЕ 1…… 162
Антибактериальная активность штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes*
ПРИЛОЖЕНИЕ 2…… 167
Противоплесневая активность штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes*

ПРИЛОЖЕНИЕ 3…… 169
Показатели роста штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06 на питательных средах и растительных субстратах
ПРИЛОЖЕНИЕ 4…… 174
Динамика накопления биомассы штаммами *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06
ПРИЛОЖЕНИЕ 5…… 175
Влияние оптических излучений на показатели роста штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06
ПРИЛОЖЕНИЕ 6…… 179
Влияние акустических волн на показатели роста штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06
ПРИЛОЖЕНИЕ 7…… 180
Лабораторный регламент
ПРИЛОЖЕНИЕ 8…… 190
Акт дегустации
ПРИЛОЖЕНИЕ 9……... 193
Характеристики покрытий метилцеллюлозы с добавками на основе штамма *Trametes versicolor* B 08/06

ВВЕДЕНИЕ

Основными факторами, влияющими на показатели качества пищевой продукции, такие как физико-химичекие и органолептические характеристики, безопасность – являются условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (из родов *Bacillus, Clostridium, Escherichia, Proteus, Salmonella, Shigella*) и микромицеты (из родов *Aspergillus, Candida, Cladosporium, Fusarium, Odium, Penicillium*), вызывающие порчу пищевых продуктов. Особую опасность представляют токсинообразующие микромицеты рода *Penicillium*, которые распространены повсеместно на предприятиях перерабатывающей и пищевой промышленности России и вызывают плесневение и ухудшение качества сырья и продукции, растительного и животного происхождения [67, 220, 239].

Большинство добавок, используемых для сохранения качества продуктов, имеют химическую природу. В связи с тем, что многие производители пытаются найти альтернативную замену ингредиентам, имеющим индекс «Е», становится актуальным вопрос о получении добавок природного происхождения. Одним из перспективных направлений в этой области может являться получение пищевых добавок на основе грибов класса *Basidiomycetes*, обладающих антибактериальными, фунгицидными, антиоксидантными и противоопухолевым свойствами [197, 219, 255, 260].

Большинство современных исследований по использованию базидиомицетов в пищевой промышленности посвящено разработке проблем получения плодовых тел. В различных странах в качестве продуцентов используют высшие грибы родов: *Agaricus, Boletus, Coriolus, Calvatia, Flammulina, Ganoderma, Grifola*, *Inonotus, Lentinus, Pholiota*, *Pleurotus* [8, 9, 21]. Использованию базидиомицетов, как продуцентов биологически активных веществ, а также противомикробных препаратов для пищевой промышленности, особенно среди представителей родов *Fomitopsis* и *Trametes*, уделяется крайне мало внимания. В основном природные плодовые тела

представителей данных родов применяют для получения БАДов и фармацевтических препаратов [79, 108, 163].

В настоящее время, бесспорно, установлено, что мицелиальную биомассу базидиомицетов можно использовать как источник биологически активных соединений и пищевых добавок [24, 50, 115]. Это имеет ряд преимуществ: возможность получения глубинного мицелия современными биотехнологическими способами, экологичность и безотходность производства, недефицитность сырьевых ресурсов. Промышленное производство функциональных препаратов для пищевой промышленности, созданных на основе глубинного мицелия грибов, только начинает налаживаться [6, 63].

Одной из причин отсутствия широкомасштабного производства мицелия базидиомицетов является их низкая скорость роста и длительная адаптация к источникам углеродного и азотного питания. Кроме того, для получения препаратов мицелия необходим поиск наиболее продуктивных и биологически активных штаммов. Поиск таких штаммов перспективно проводить среди изолятов, выделенных в мало изученных регионах России, таких как Западная и Восточная Сибирь и Республика Тыва. Скрининг штаммов среди этой группы макромицетов необходимо также осуществлять по показателям противомикробной активности, скорости роста и токсичности. Изучение штаммов дереворазрушающих грибов представителей родов *Fomitopsis* и *Trametes* открывает перспективы использования их в биотехнологии препаратов для пищевой отрасли.

Цель работы – изучение противомикробных свойств ксилотрофных базидиомицетов – представителей родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении возбудителей порчи пищевых продуктов, и оценка перспектив применения антагонистически активных штаммов в пищевой промышленности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- определить противомикробную активность штаммов базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении опасных

контаминантов и возбудителей порчи пищевых продуктов и провести скрининг штаммов, обладающих высокой активностью;

- изучить морфолого-культуральные, физиологические и молекулярно-генетические свойства антагонистически активных штаммов базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes* и идентифицировать их до вида*;*
- определить показатели роста антагонистически активных штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* при различных условиях культивирования;
- исследовать влияние когерентного и некогерентного света и акустических волн в слышимом диапазоне частот на ростовые показатели мицелия антагонистически активных штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor*;
- определить хитиназную и целлюлазную ферментативную активность штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor*;
- исследовать токсичность мицелия штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* в отношении инфузорий *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis;*
- определить биохимический состав и переваримость биомассы мицелия штаммов базидиомицетов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* на установке «искусственный желудок»;
- провести оценку возможности использования препарата мицелия штамма *T. versicolor* В 08/06 как пищевой добавки при производстве мясопродуктов;
- разработать технологию полимерного покрытия пищевых продуктов, содержащего в качестве «активного» компонента мицелий штамма *T. versicolor* В 08/06, и оценить противомикробные свойства пленок.

Научная новизна работы

В результате исследований установлено, что штаммы базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes* обладают широким спектром антибактериальной активности в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов: *Bacillus coagulans, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans* – опасных контаминантов пищевых продуктов.

В условиях активного роста базидиомицеты из родов *Fomitopsis* и *Trametes* проявляют антагонистическую активность в отношении микромицетов *Penicillium: P. commune, P. brevicompactum, P. polonicum, P. roqueforti* и *P. nalgiovense,* вызывающих порчу пищевых продуктов. Антагонистические свойства штаммов базидиомицетов в отношении микромицетов рода *Penicillium* обусловлены наличием у исследуемых штаммов хитиназной и целлюлазной активности.

На основании исследований культурально-морфологических, физиологических и молекулярно-генетических свойств установлена принадлежность антагонистически активных штаммов базидиомицетов к видам *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor.*

Показано, что при твердофазном и жидкофазном культивировании когерентный и некогерентный свет производит стимулирующий эффект на рост мицелия *T. versicolor,* а на штаммы рода *Fomitopsis* достоверного влияния не оказывают.

Установлено, что биомасса мицелия штаммов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* не является токсичной в отношении инфузорий *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis* и может быть рекомендована при разработке кормовых добавок для животных.

На основании исследований физиологических, культуральных, биотехнологических и биохимических свойств для разработки пищевых добавок отобран антагонистически активный штамм *T. versicolor* В 08/06,

мицелий которого содержит 17,9 % белка с переваримостью 15,9 мг тирозина/г белка.

Впервые предложено использование штамма вида *Trametes versicolor* в качестве «активного» компонента в полимерном покрытии для защиты пищевых продуктов.

Практическая значимость работы:

- штамм *T. versicolor* В 08/06, депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов с коллекционным номером ВКПМ F-1024 как продуцент противоплесневых препаратов и рекомендован для разработки функциональной пищевой добавки и как «активный» компонент полимерного покрытия;

- разработаны рекомендации по применению когерентного света с выходной мощностью 33 мВт для ускорения роста мицелия штамма *T. versicolor* В 08/06 в условиях погруженного и поверхностного культивирования;

- показана возможность биоконверсии штаммами *F. pinicola* и *T. versicolor* растительных отходов предприятий АПК для получения кормовых добавок животным;

- разработан способ получения полимерного покрытия нового типа методом биоконверсии метилцеллюлозы штаммом *T. versicolor* В 08/06 для защиты поверхности пищевых продуктов от плесневения и микробной порчи;

- проведены испытания опытных партий препарата мицелия штамма *T. versicolor* В 08/06 и даны рекомендации по разработке на его основе функциональной добавки для производства мясопродуктов.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXIII Международной научно-технической конференции «Лазеры в науке, технике, медицине» (Дивноморск, 2012); III Съезде микологов России (Москва, 2012); Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012); X Международной научно-практической конференции с международным участием «Живые системы и

биологическая безопасность населения» (Москва, 2012); Международной научно-практической конференции «Инновационное развитие современной науки» (Уфа, 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); IV Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014); Общеуниверситетской научной конференции молодых ученых и специалистов «День науки» (Москва, 2014); III Международной научно-практической конференции «Наука и Образование XXI века» (Уфа, 2014).

ГЛАВА 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНТАМИНАНТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАЗИДИОМИЦЕТОВ ИЗ РОДОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*: ОЦЕНКА ОПЫТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ

1.1 Характеристика биологических контаминантов пищевой продукции и современных способов борьбы с ними

Обеспечение безопасности пищевых продуктов – одно из главных направлений в пищевой промышленности, связанное как с ухудшением экологической ситуации в целом, так и с несоблюдением технологических регламентов по производству продукции и ее хранению. Безопасность сырья и готовой продукции оценивают по количественному и качественному содержанию контаминантов химической, биологической и микробиологической природы [102].

Наиболее важными для производителей и опасными для потребителей являются микробиологические показатели безопасности сырья и готовых продуктов. Основная характеристика качества - отсутствие таких условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, как *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, Staphilococcus aureus*, а также токсикогенных штаммов микроскопических грибов родов *Penicillium, Mucor, Aspergillus, Eurotium* [67, 72, 143, 155, 194]. По данным Г.Д. Аверина до 20-30 % всех готовых продуктов в мире теряется ежегодно в связи с наличием возбудителей порчи в продукции [113].

Производства мясных и молочных продуктов (особенно сыров) являются наиболее трудоемкими и требующими экономических затрат. Основные составляющие этих продуктов (белки, жиры, лактоза) - благоприятная среда для развития плесневых грибов, большинство из которых являются продуцентами опасных вторичных метаболитов: афлотоксина, охратоксина А, микофеноловой кислоты, цитиринина [139, 192, 244].

Исследования, проведенные Л.С. Кузнецовой на 27 мясоперерабатывающих предприятиях России, показали, что биологическими контаминантами поверхности продукции, а также производственных помещений являются бактерии родов *Bacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Micrococcus*; дрожжи родов *Candida, Saccharomyces, Rhodotorula, Torulopsis*; и микроскопические грибы (контаминация ими составляет до 66 %) *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Cladosporium, Thamnidium, Rhizopus.* Среди грибов, вызывающих плесневение пищевых продуктов, основными контаминантами колбасной продукции (твердокопченые колбасы и мясные деликатесы) являются преимущественно ксеротолерантные виды рода *Penicillium* (более 80 %): *P. commune, P. nalgiovense, P. chrysogenum, P. solitum, P. olsonii, P. verrucosum, P. oxalicum, P. camemberti, P. expansum, P. miczynskii, P. simplicissimum, P. carneum* [66, 67]. Тождественные данные были получены в результате исследований, проведенных на мясоперерабатывающих заводах Европы [135, 146, 205, 218]. На предприятиях Испании виды рода *Penicillium* также составляют более 80 % от всех видов выделенных плесневых грибов, среди них преобладали: *P. commune, P. chrysogenum* – причем, как отмечено авторами, большинство штаммов были высоко токсигенными [134, 141]. В странах Северной и Центральной Европы среди контаминантов рода *Penicillium* преобладают, такие вредоносные виды, как *P. brevicompactum, P. polonicum* [245, 246].

Развиваясь на поверхности твердых сыров, плесневые грибы могут поражать продукт по всей его массе, что приводит к большим его потерям, до 15-20 %. Наиболее распространенным видом в составе грибов рода *Penicillium,* контаминирующих сырную продукцию, является *P. roqueforti* [153]. Кроме того, выявлены другие микромицеты: *Penicillium verrucosum; Penicillium aurantiogriseum; Penicillium chrysogenum; Penicillium expansum; Penicillium citrinum*, также поражающие твердые сыры и вызывающие их порчу [73].

Грибы рода *Penicillium* имеют несовершенную стадию и относятся к классу *Eurotiomycetes.* Микромицеты данного рода образуют мучнистые

колонии от бледно-желтого до фиолетового или темно-коричневого цвета. Вегетативный мицелий - ветвящийся, прозрачный, многоклеточный. Гифы мицелия могут быть, либо быть погруженными в субстрат, либо располагаться на его поверхности. От гифов отходят прямостоячие или приподнимающиеся конидиеносцы, несущие цепочки одноклеточных окрашенных спор – конидий, с помощью которых происходит размножение микромицетов [176].

На данный момент известно около 300 видов грибов рода *Penicillium* [189]. Большинство микромицетов данного рода являются продуцентами микотоксинов, которые характеризуются иммунодепрессивными, мутагенными, тератогенными, цитотоксическими и канцерогенными свойствами [139, 196, 203]. Несмотря на то, что грибы рода *Penicillium* широко распространены в почве (особенно доминируют в зонах умеренного климата), в организм людей они попадают непосредственно через употребление контаминированных пищевых продуктов.

Поражение поверхности продовольственного сырья и продуктов питания мицелиальными грибами, в частности, микромицетами рода *Penicillium*, является одним из основных инициаторов порчи пищевой продукции [155]. Данные микроорганизмы ухудшают внешний товарный вид продукции, снижают вкусовые качества, вызывают изменения белков и липидов, продуцируют токсичные вещества, вызывающие пищевые отравления, дисбактериозы, аллергические реакции, нарушение обмена веществ, а также создают благоприятные условия для жизнедеятельности бактерий, в том числе и болезнетворных [139, 195, 215].

По некоторым оценкам, повреждающему действию мицелиальных грибов подвержено до 25 % произведенного продовольствия в мире [22]. Рост плесени на поверхностях пищевых продуктов большинством производителей рассматривается и как экономическая, и как эстетическая проблема [246]. Для борьбы с ней, на мясоперерабатывающих предприятиях плесневый налет с поверхности колбас удаляют вручную с помощью воды или растительного масла, в связи с чем, продукции приобретает несвойственный запах. Причем

механическое удаление видимых колоний мицелиальных грибов с поверхности пищевых продуктов не исключает присутствия в них опасных метаболитов – продуктов жизнедеятельности данных грибов [196, 203]. Кроме того, многие виды плесеней даже при низких температурах хранения образуют микотоксины, которые диффундируют в продукт [107, 244].

В настоящее время для предотвращения плесневения поверхности пищевых продуктов, в том числе твердокопченых колбас и твердых сыров, с успехом применяют антисептики и консерванты химической природы (соли бензойной и дегидроцетовой кислот), фитонциды, органические кислоты (сорбиновая, бензойная, дегидроцетовая), а также композиции химических веществ, которые используются как для обработки поверхности готовой продукции, так и при производстве упаковочных материалов и покрытий, обладающих активным противомикробным действием [65, 66, 204]. В случае использования данных соединений требуется контролирование уровня их проникновения в продукт и нередко проведение дополнительных мероприятий при производстве продукции, например, введение дополнительной оболочки. Одним из перспективных направлений в данной области может служить создание биоупаковок с природными антимикробными соединениями. Например, большой потенциал представляют пленки на основе белкового вещества глиадина с добавлением коричного альдегида в качестве «активного» компонента, которые эффективны в отношении представителей родов *Aspergillus* и *Penicillium* [144].

На некоторых пищевых производствах для деконтаминации поверхности пищевых продуктов используют физические методы воздействия, например, такие как нетепловой метод импульсивного УФ-излучения, который основан на использовании интенсивных методов коротких импульсов. Данное воздействие не приводит к нагреванию продукта, изменению его качественных характеристик, а также к ухудшению структурных показателей упаковочных материалов [153].

Одним из перспективных направлений защиты поверхности пищевых продуктов от поражения плесневыми грибами является использование доброкачественных грибов или доброкачественной плесени, которые не только защищают продукты от биологических контаминантов, но и придают им своеобразные вкус и аромат, продлевают сроки хранения при комнатной температуре [66, 118].

Большое количество сырокопченых и сыровяленых колбас с доброкачественной плесенью производят в Румынии, Венгрии, Испании, Италии – это такие виды как Salchichón, Longaniza, Ciauscolo.

Антимикробная устойчивость данных продуктов к пищевым контаминантам осуществляется за счет использования в процессе производства молочнокислых бактерий (LAB) [168, 236, 237, 253]. Наиболее распространенными видами для созревания сыровяленых колбас являются *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis* [138, 147, 243].

Также известно, что одним из перспективных видов микроорганизмов для сохранения качества мясной продукции являются дрожжи *Debaryomyces hansenii*, используемые для созревания сыровяленых продуктов и способные ингибировать наиболее распространенные виды микромицетов рода *Penicillium* [118, 137, 154].

Однако, особое внимание стоит обратить на грибы. Они создают налет плотной белой или серой плесени на оболочке, что придает особый внешний вид колбасе, и регулируют выделение влаги при сушке сырокопченых колбас, снижают вероятность погоркания липидов. Использование доброкачественных грибов позволяет в определенной степени компенсировать колебания влажности воздуха в камере созревания и способствует образованию специфического аромата колбасы [130, 171]. Так при производстве «Итальянской салями» для защиты батонов применяют налет из белой плесени штаммов вида *Penicillium nalgiovense* [171, 216].

Одним из приоритетных направлений развития современной биотехнологии является разработка методов использования базидиальных грибов для получения биологически активных соединений, проявляющих противомикробную активность.

1.2 Характеристика ксилотрофных базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes*

Ксилотрофные базидиомицеты – это многочисленные трутовики, основная функция которых – деструкция или биологическое разрушение лигноцеллюлозных субстратов, в основном древесины, находящейся на различной стадии разложения, от свежего отпада до почти гумифицированных остатков [12, 14, 20].

Грибы родов *Fomitopsis* и *Trametes* относятся к наиболее известному отделу *Basidiomycota*, классу *Basidiomycetes*, подклассу *Homobasidiomycetidae*, порядку *Aphyllophorales*, семейству *Poriaceae (Poliporaceae)*. Причем, род *Fomitopsis* относится к подсемейству *Gloeophylloideae,* а род *Trametes* к подсемейству *Trametoideae*. Определение их производится на основе комплекса макроскопических и микроскопических признаков [10, 11, 20, 75].

1.2.1 Общая характеристика грибов рода *Fomitopsis*

Род *Fomitopsis* в настоящее время представлен 109 видами [181, 182]. Наиболее изученными среди них являются *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis nigra, Fomitopsis officinalis*.

Вид *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing. (лиственничная губка) - уникальный представитель рода *Fomitopsis*, вследствие наличия в плодовых телах агарициновой кислоты, обладающей лекарственными свойствами известными в медицине уже несколько веков [19, 79, 207, 212].

Базидиомы гриба многолетние, сидячие, одиночные, копытообразной формы или вытянутые вверх, почти цилиндрические, толстые, плотные и твердые, с

возрастом ломкие, размерами 5-20 см в ширину, 4-60 см в длину и весом до 3 кг, редко более (рисунок 1). Отдельные представители могут достигать большого веса, у самых старых экземпляров плодовых тел можно насчитать до 70 слоев гименофора. Поверхность базидиомы шероховатая, концентрически-бороздчатая, с бледными, беловатыми, желтыми и коричнево-бурыми зонами, шишковатая, с тонкой, сильно растрескивающейся коркой. Край тупой, закругленный, не отличающийся по окраске от поверхности плодового тела. Ткань мягковатая в свежем состоянии, позднее твердеющая, крошащаяся и рыхлая, легкая, белая, желтоватая, горькая на вкус, со слабым мучнистым запахом. Трубочки неясно слоистые, одного цвета с тканью, 5-10 мм длиной в каждом слое. Поверхность гименофора от белой до буроватой. Поры округлые до угловатых, с цельными, со временем разорванными краями, в среднем 3-5 на 1 мм, иногда до 1 мм в диаметре [10].

Рисунок 1 – Внешний вид плодового тела гриба *Fomitopsis officinalis*

Гифальная система димитическая. Генеративные гифы тонкостенные, гиалиновые, с перегородками и пряжками, слабо ветвящиеся, 2-4 мкм в диаметре, лучше наблюдаемые в растущем крае. Скелетные гифы волнистые, длинные, толстостенные до сплошных, 2,5-5 мкм в диаметре. В ткани имеются также сосудовидные тонкостенные, с простыми перегородками, часто извитые или ветвящиеся гифы 6-13 мкм в диаметре, с сильно цианофильными стенками. Склериды (сильно вздутые, толстостенные участки скелетных гиф) до 20 мкм в

диаметре. Базидии булавовидные, 4-х споровые, длинной 20-25мкм и шириной 6-8 мкм. Споры эллипсоидальные реже яйцевидные, у основания приостренные, гиалиновые, с гладкой оболочкой, бесцветные, изредка слегка желтоватые, длинной 4,5-6,5 мкм и шириной 3-4 мкм, часто с капелькой масла внутри. При прорастании они образуют мицелий, развивающийся в коре дерева и вызывающий его заболевание. Цистид и других стерильных элементов гимения нет [10, 11].

Плодовое тело лиственничной губки на 60—65 % состоит из липидных веществ, растворимых в эфире, тогда как количество их в мицелии, выращенном на искусственной среде — 6,5 %, а на среде с лиственничными опилками — 11 %. В природных условиях для гриба характерно низкое содержание азота, углеводов и золы. Мицелий же, выращенный на пептоне, накапливает до 6 % азота, что составляет 36 % сырого протеина.

Количество углеводов в мицелии, включая гемицеллюлозу и целлюлозу, составляет 42,9 %. В плодовом теле содержится 1,7 % лигнина, в мицелии, выращенном на среде с лиственничными опилками, — 13,9 %, а на среде без опилок — 13,0 %. Мицелий состоит в основном из углеводов и белковых веществ, а плодовое тело содержит в основном вещества вторичного происхождения, которые представлены тритерпеновыми кислотами, из которых идентифицированы эбуриколовая и агариколовая кислоты, количество которой достигает 16-18 % [2, 60, 78, 86].

Кроме того, в плодовом теле содержатся другие, растворимые в воде кислоты, такие как щавелевая, яблочная, лимонная, фумаровая и рициноловая. Обнаружены D-глюкозамин, эргостерин, ситостерин, глюкоза, манит, жирное масло и пигмент, близкий к антоцианидам. Для лиственничной губки характерно также очень высокое содержание смол (30—80 %), количество которых значительно увеличивается с возрастом плодовых тел [57, 79, 83].

Кроме того, в последние годы были получены из этанольных экстрактов плодовых тел *Fomitopsis officinalis* и идентифицированы два новых

хлоринатных кумарина, которые, по мнению исследователей, отвечают за антимикробную активность вида [183].

Вид *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. (трутовик окаймленный) — достаточно распространённый гриб-трутовик, сапрофит. Плодовые тела многолетние, сидячие, приросшие боком (рисунок 2). В молодости округлые или полукруглые, блестящие, липкие, у основания с краснобурым диском, остальное сероватое или ярко-оранжевое с толстым светлым или ррозоватым округлым краем. Форма плодового тела изменчивая, бывает подушкообразной или копытообразной. Ножка гриба отсутствует. В сырую погоду на плодовом теле часто видны очень крупные капли прозрачной жидкости. Шлыпка средних размеров, у старых грибов 15-30 см шириной и до 10 см в высоту. Характерной особенностью шлыпки является наличие хорошо различимых концентрических зон, разделенных углублениями и различных по цвету [10].

Рисунок 2 – Внешний вид плодового тела гриба *Fomitopsis pinicola*

Цвет молодых плодовых тел желтоватый или красновато-охристый, затем становится красновато-бурым или почти черным с хорошо выраженной твердой черноватой, блестящей поверхностью. Старые участки шляпки имеют серовато-сизый или темный серо-коричневый, часто почти черный оттенок. Внешний растущий валик имеет характерный красный, оранжевый (иногда киноварно-красный) или желто-оранжевый цвет с более светлой наружной кромкой. Кожица матовая неровная, ближе к центру бывает слегка смолистой. Мякоть плотная, упругая, войлочная или напоминающая пробку, изредка деревянистая. На разломе хлопьевидная. Мякоть обычно имеет светлый желтовато-бежевый

или светло-бурый оттенок, но у старых плодовых тел может быть каштанового цвета или даже шоколадно-коричневая [10].

Гименофор трубчатый, мелкопористый, расположен горизонтально. Поры до 0,5 мм в диаметре, округлые, цельные. Цвет бежевый или кремовый, обычно с розовым оттенком. При надавливании темнеет до темно-бурого или серо-бурого цвета. Споровый порошок светлый, кремовый, беловатый или желтоватый. Спороношение очень обильное. В теплую сухую погоду споровый порошок бывает хорошо виден ниже плодового тела. Споры бесцветные, мелкие (6-8×3,5-4 мкм) яйцевидной или эллипсовидной формы [10, 11].

В состав мицелия входят: белки, углеводы, липиды, а также тритерпены, стерины (эргостерин, ланостерин), эргостерол, инотодиол, ряд органических кислот (С полипореновая кислота, эбуриколовая кислота, 21-гидрокси-ланоста-7 пиниколиковая кислота) [187, 257].

Исследования биохимического состава водных экстрактов мицелия *Fomitopsis pinicola* показало наличие белков 8,5 мг/г, полисахаридов 135,4 мг/г, флаваноидов 47,5 мг/г, причем группа флавоноидов представлена дегидрокверцитином и лютеолин-7-гликозидом. В ходе исследования установлено, что при замене экстрагента на этанол, значения всех показателей существенно снижаются [62].

Также мицелий *Fomitopsis pinicola* является источником протеаз, которые можно использовать в качестве замены химозина, и лакказ, которые имеют большие перспективы для использования в промышленности [70, 217].

1.2.2 Общая характеристика грибов рода *Trametes*

Род *Trametes* Fr. Представлен 627 видами, но самый известный и распространенный среди них – «космополит» *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd (трутовик разноцветный) [181, 182].

Базидиомицет имеет однолетние базидиомы, растущие черепитчато или и розетках часто срастающиеся основаниями, половинчатые, чаще вееровидные

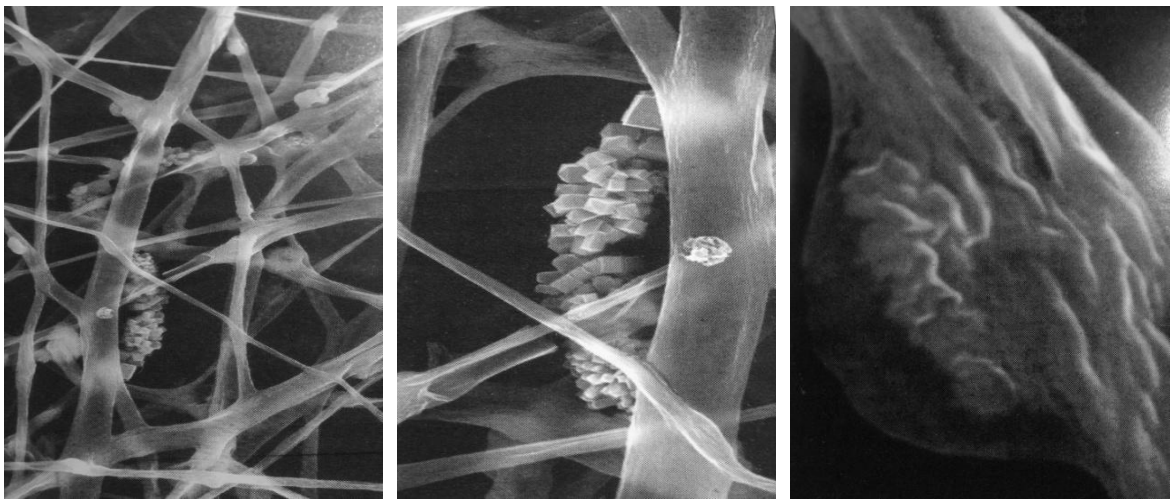
или раковинообразные, прикрепляющиеся к субстрату суженным основанием тонкие, кожистые, длинной 1-6 см и шириной 1-8 см (рисунок 3).

Рисунок 3 – Внешний вид плодового тела гриба *Trametes versicolor*

Поверхность шляпки концентрически-зональная, с различно окрашенными в оттенки черного, серого, сине-черного, голубовато-бурого, желто-коричнево-бурого, желтовато-коричневого цветов зонами, гладкая, бархатистая, часто блестящая. Поры от округлых до угловатых, у молодых экземпляров с цельными, позднее зубчато-надрезанными или расщепленными краями, в среднем 3-5×1 мм [11, 20, 104].

Край обычно более светлый, чем остальная поверхность, тонкий, острый, стерильный снизу. Ткань тонкая, белая кожистая иногда несколько клочковатая, с заметной темной зоной под слоем опушения. Запах и вкус отсутствуют. Трубочки короткие, длинной до 1-2 мм. Поверхность трубчатого слоя белая, беловатая, кремовая, соломенно-желтая. Гифальная система тримитическая. Генеративные гифы трудно различимые, тонкостенные, септированные, с пряжками, 2-4 мкм в диаметре. Скелетные гифы толстостенные до сплошных, не ветвящиеся, не септированные, длинные, 4-6 мкм в диаметре. Связывающие гифы толстостенные до сплошных, сильно извитые и разветвленные, 2,5-5 мкм в диаметре. Волоски поверхности шляпки образованы гифами 3-6 мкм в диаметре, гиалиновыми или соломенно-желтыми. Базидии длинной 10-15 мкм и шириной 4-5 мкм. Споры от цилиндрических до

аллантоидных длинной 5,5-6,0 мкм и шириной 1,5-2,5 мкм, гладкие, гиалиновые, без капли (рисунок 4). Споровый порошок желтоватый [11, 149].



А Б В

Рисунок 4 – Сканирующая-электронная микроскопия мицелия *Trametes versicolor:*

А - пряжки, анастамозы, кристаллы на гифах, хламидоспоры (×1500); Б - кристаллы на гифах (×4000); В – пряжка (×15000)

Гриб *Trametes versicolor* является продуцентом различных биологически активных веществ: полисахаропептидов; полисахаридов; глюканов; гликопротеинов; тритерпенов; флавоноидов; хитиновой клетчатки; внеклеточных гидролитических и окислительных ферментов; полиненасыщенных жирных кислот; высококачественного белка, включающего в себя все незаменимые аминокислоты; витаминов; микроэлементов в легкоусвояемой органической форме.

Ряд исследований химического состава мицелия и плодовых тел *T. versicolor* показал, что количество экстрактивных веществ в мицелии базидиомицета данного вида значительно превосходит их количество в плодовом теле. В обоих случаях количество экстрактивных веществ увеличивается в условиях исчерпывающей экстракции - 23,3 %, по сравнению с холодной и горячей - 15,3 % и 3,9 % , соответственно.

Количество общего белка в мицелии составляет 14,6 %, и с возрастом его количество изменяется незначительно. В плодовых телах гриба *T. versicolor* доля белка составляет 7,2 %, что почти в два раза ниже, чем в мицелии.

Сравнительная оценка аминокислотного состава мицелия и плодовых тел *T. versicolor* показала, что содержание незаменимых аминокислот в плодовых телах гриба от общего количества аминокислот превосходит почти на 30 % этот показатель в мицелии. Причем в мицелии наблюдается преобладание таких незаменимых кислот как изолейцин, лейцин и тирозин, в то время как в плодовых телах - лейцин и тирозин [60].

T. versicolor содержит большое количество полисахаридов, выполняющих множество функций, причем количество легкогидролизуемых углеводов в мицелии значительно отличается от количества трудногидролизуемых углеводов. Так, на 15-ые сутки культивирования количество легкогидролизуемых углеводов составляет 41,6 %, в то время как трудногидролизуемых только 12,9 % [132, 197, 232].

Содержание общего количества липидов в мицелии штаммов варьирует от 1,02 до 1,49 %. Липидная фракция включает нейтральные, липиды, гликолипиды и фосфолипиды. Наблюдается преобладание нейтральных липидов.

Лигнинолитическая ферментная система *Trametes versicolor* является внеклеточной, окислительной и неспецифической и включает в себя такие ферменты, как лигнин пероксидазу, Mn-пероксидазу и лакказу, которые являются высокопотенциальными ферментами и обладают широкой субстратной специфичностью по отношению к различным органическим и неорганическим соединениям, в особенности лигнину древесины, что делает возможным их использование совместно с медиаторами во многих областях промышленности [260].

Макромицеты *Trametes versicolor* также являются продуцентами целлюлаз, которые осуществляют биодеградацию целлюлозы, самого распространенного биополимера на Земле [170].

1.3 Опыт практического использования высших базидиомицетов как продуцентов биологически активных веществ

В последнее время благодаря прогрессивному развитию промышленного грибоводства во всём мире увеличились объёмы производства (до 20 млн тонн в год) и потребления культивируемых съедобных грибов определённых видов, таких как *Agaricus* spp., *Pleurotus* spp., *Volvariella* spp., *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* и др. Наряду с экономической и экологической целесообразностью важными аргументами в пользу дальнейшего увеличения объемов производства культивируемых грибов является их ценность как функциональных пищевых продуктов, а также возможность использования отдельных видов макромицетов в качестве объектов современных технологий для получения диетических, лечебно-профилактических и лекарственных препаратов [117, 150, 200].

Вопросам изучения биологически активных и лекарственных веществ, изолированных из высших базидиомицетов, посвящено большое число экспериментальных работ. Спектр действия биологически активных веществ базидиомицетов разнообразен: одни могут быть антиметаболитами, аллергенами, галлюциногенами, предшественниками синтеза мутагенных, тератогенных и канцерогенных веществ; другие – обладать выраженными антибиотическими, фунгицидными, противораковыми, иммуномодулирующими, антиоксидантными и другими фармакологическими свойствами. В настоящее время перечень используемых базидиомицетов расширился, как и изучение их биологических свойств, а также отраслей, где используются активные вещества, продуцентами которых являются высшие грибы [156, 202, 234, 258].

Последнее время открыт и идентифицирован целый ряд новых антибиотических веществ, в частности из афиллофоральных грибов, которые, в отличие от предшественников, проявляют высокую антибиотическую активность, являются стойкими соединениями и не токсичны [106, 175, 267].

Антимикробные соединения представлены низко- и высокомолекулярными веществами. К низкомолекулярным веществам относят в основном метаболиты, такие как терпены, стероиды, хинолины, но встречаются и первичные метаболиты, например, оксалиновая кислота; к высокомолекулярным - в основном пептиды и белки [13, 91, 136]. Особый интерес представляют составы, эффективные против резистентных штаммов, например, устойчивого золотистого стафилококка, а также микроорганизмов, ответственных за кожные заболевания: *Pityrosporum ovale, Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes*. К ним относятся гидрохиноны, например, ганомицины – производные *G. pfeifferi*. Показано, что базидиомицеты видов *Flammulina velutipes, Piptoporus betulinus* и *Oudemansiella mucida* синтезируют антибиотические вещества антифунгального действия [174]. Кроме того антифунгальные соединения, липидной природы, полученные из плодовых тел, в отношении тест-организмов рода *Candida* синтезируют съедобные грибы вида *Pleurotus giganteus* [219]. Также противокандидозную активность проявляют грибы видов *Pleurotus ostreatus* и *Coprinus comatus,* которые проявляют антибиотические свойства в отношении тест-культур грамположительных и грамотрицательных бактерий и представляют интерес для использования в функциональных продуктах [254].

С использованием современных тест-систем (культуры клеток МТ-4) показано, что низкомолекулярные соединения, такие как тритерпены, выделенные из вида *G. lucidum*, обладают активностью против вируса иммунодефицита типа HIV-1, а терпеновые соединения из других видов рода *Ganoderma* инактивируют *in vitro* вирус герпеса и вирус гриппа типа А [172, 211]. Активностью против вирусов гриппа типа А и В обладают экстракты из мицелия съедобных грибов *Kuehneromyces mutabilis, Flammulina velutipoes, Pleurotus eryngii*, экстракты и фенольные компоненты плодовых тел *Inonotus hispidus*, а также некоторые производные эргостерола, содержащиеся в базидиальных грибах [193, 202].

Высокомолекулярные соединения базидиальных грибов также обладают противовирусными свойствами. Например, сульфат лентинана из *L. edodes*

полностью ингибирует вызываемую ВИЧ цитопатическую активность, полисахариды PSK и PSP из *T. versicolor in vitro* проявляют антивирусные свойства в отношении ВИЧ и цитомегаловируса [148].

Еще в середине прошлого века было установлено действие экстрактов ряда грибов на рост клеток опухоли линии саркома S-180, привитой мышам. Начиная с этого времени стали проводиться эксперименты по установлению противоопухолевой активности грибных изолятов: гетерополисахаридов, α- и β-глюканов, белков, белково-полисахаридных комплексов, жирных кислот, терпеноидов, стеролов, фенольных кислот, механизмов их действия, а также определения химической природы противоопухолевых веществ [222].

Белково-полисахаридные комплексы способны тормозить рост опухолей, привитых подопытным животным. Их основными компонентами являются высокомолекулярные глюканы, гликаны и гетерополисахариды [131, 261]. К первым полисахаридным препаратам онкостатического действия, которые начали производить в Японии, относятся крестин (PSK) из мицелия *Trametes (Coriolus) versicolor*; лентинан (LE), получаемый из плодовых тел *Lentinus edodes* и сонифиллан (SPG), более известный как шизофиллан, который получают из культуральной жидкости *Schizophyllum commune* при культивировании мицелия на жидких средах [160, 177, 235]. На данный момент установлено, что положительное действие экстрактов многих видов лекарственных грибов на увеличение продолжительности жизни и выживаемость подопытных животных с привитыми опухолями способствуют не только иммуностимулирующие полисахариды, но и такие биологически активные компоненты, как терпены, производные эргостерола, белки, меланиновые комплексы и другие вещества, обладающие также антиоксидантным действием [4, 5, 191, 202, 233].

Полисахаридные препараты, полученные из *Ganoderma lucidum, Tremella fuciformis, Grifola frondosa* и других лекарственных видов базидиомицетов, повышали активность лейкоцитов и стимулировали продукцию цитокинов IL-12, IL-6, интерлейкинов, макрофагов, Т-лимфоцитов и других звеньев защитной

системы организма животных и человека, демонстрируя активность против ряда вирусов, включая вирус гепатита [180, 199, 256, 258]. Специфика действия на иммунную систему пептоглюканов, гликанов и гетерополисахаридов, изолированных из различных видов макромицетов, обусловлена особенностями первичной и других уровней структуры их молекулы, разветвлённостью боковых цепей, физико-химическими свойствами и высокой молекулярной массой [262, 263].

Способностью непосредственно подавлять рост разных линий раковых клеток в соответствующих клеточных тест-системах обладают также некоторые низкомолекулярные метаболиты макромицетов [198]. Например, тритерпен инотодиол, обнаруженный в плодовых телах *Inonotus obliquus*, *Fomitopsis pinicola* и *Phellinus igniarius* [265, 266]. В настоящее время активно продолжаются дальнейшие исследования низкомолекулярных биологически активных веществ грибов, в том числе имеющих цитолитическое действие, на клетки злокачественных опухолей, таких как карцинома Эрлиха [222, 235].

Установлено, что высшие базидиальные грибы являются источником антиоксидантных компонентов, которые нейтрализуют вредное действие свободных радикалов и играют большую роль при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, рака и других патологий. При использовании различных методов и тест-систем *in vitro* и *in vivo* высокая антиоксидантная активность показана для экстрактов из плодовых тел многих видов дикорастущих и культивируемых съедобных и лекарственных грибов, включая виды рода *Pleurotus*, а также *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus, Agrocybe aegerita, Inonotus tamaricis, Laetiporus sulphureus, Ganoderma lucidum, Trametes versicolor* и др. [140, 142, 158, 185, 231, 241, 254].

Современная индустрия по производству лекарств предлагает целый ряд водно-спиртовых экстрактов из плодовых тел и мицелия лекарственных грибов *Flammmulina velutipes, Hericium erinaceus, Phellinus linteus, Trametes versicolor, Agaricus brasiliensis* для комплексной профилактики и помощи в лечении целого ряда заболеваний [247, 248].

1.3.1 Использование грибов рода *Fomitopsis*

Грибы рода *Fomitopsis* начали широко применяться еще в Средние века в европейской медицине. Они считались одними из лучших лекарств от различных заболеваний: геморрой, расстройство мочевого пузыря, ревматизма, в качестве жаропонижающего средства [173, 174, 229]. Сейчас проводятся перспективные исследования по применению фомироида А, продуцируемого видом *Fomitopsis nigra*. Данное соединение может регулировать содержание липопротеидов низкой плотности в крови человека при гиперхолестеролемии – состоянии, которое может спровоцировать атеросклероз сосудов, а следовательно инфаркт, инсульт, гипертонию, тромбоз, распространенном во многих развитых странах [159]. Проводятся изыскания по выделению и идентификации антибиотических веществ, например, были выделены и идентифицированы тритерпены из вида *Fomitopsis rosea*, проявляющие антибактериальные свойства [221].

О целебных свойствах лиственничного трутовика - *Fomitopsis officinalis* - было известно еще древним грекам и римлянам. Древнеримский ученый Диоскорид около 2000 лет назад описывал его лечебные свойства, в частности, его способность помогать при желудочно-кишечных заболеваниях как слабительное и антигельмитное средство [10, 112]. У индейцев северо-запада Америки лиственничная губка считалась универсальным средством от множества болезней [178, 209]. Традиция использования этого гриба в лечебных целях отмечена в разных странах мира и протянулась через две тысячи лет. В России отваром лиственничной губки лечили ушибы, астму и желтуху. Примочки из настоев гриба помогали при остановке кровотечения из десен, при гнойных воспалениях глаз у новорожденных и взрослых. В конце XIX в. лиственничный трутовик начали применять как лекарство против туберкулеза [161].

Согласно справочной литературе водные экстракты плодовых тел лиственничной губки обладают седативным и кровеостанавливающим

действием, благотворно влияют на легкие и желудок [17, 68, 74, 210]. Применение в медицинской практике в Японии экстрактов из плодовых тел гриба *F. officinalis*, содержащих полисахарид ланофил, показало, что экстракт стимулирует «ленивую» печень вырабатывать ферменты для расщепления глюкозы и жира в организме, что способствует восстановлению обмена веществ. В связи с этим разработан ряд диетических рекомендаций, где обязательным компонентом является лиственничная губка.

Показана возможность применения мицелия *Fomitopsis officinalis* при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, на основании чего разработаны два препарата с мицелием лиственничного трутовика: один включает комплекс полисахаридов, эргостерона, маннита; другой – комплекс маннитола, фукозы и 13 аминокислот.

Изучение влияния углекислотных и спиртовых экстрактов плодовых тел гриба *F. officinalis* в отношении *M. tuberculosis*, выделенных от больных с различными формами туберкулеза, показали также их высокую противотуберкулезную активность. Микобактерии туберкулеза, находящиеся в состоянии покоя, проявили чувствительность к водным экстрактам лиственничной губки [78]. В немецкой и шведской фармакопее агарициновая кислота, выделенная из плодовых тел гриба *F. officinalis*, входит в состав средств, применяемых для предупреждения ночных потов у туберкулезных больных [57]. В результате последних исследований выделены из спиртовых экстрактов плодовых тел лиственничной губки и идентифицированы два новых холоринатных кумарина, проявляющие высокую противотуберкулезную активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [183].

Исследования по изучению бактерицидной активности углекислотных экстрактов из плодовых тел гриба *F. officinalis*, полученных методом гидродистилляции на промышленной установке, показали их бактериостатическую активность в отношении *B. anthracis*, *B. subtilis* и *Micrococcus luteus* и бактериолитическую активность в отношении *Vibrio spp.* [125]. Показана антимикробная активность углекислотных, водных и

спиртовых экстрактов из плодовых тел лиственничной губки в отношении штаммов условно-патогенных микроорганизмов: *Acinetobacter baumanii, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* [78]. Обнаружена бактерицидная активность вида *Fomitopsis officinalis* в отношении патогенной для человека и животных *Yersinia pseudotuberculosis* [89].

Показана противовирусная активность водных экстрактов мицелия лиственничной губки в отношении вируса гриппа А, как видов характерных для людей, так и для птиц [250].

Японские исследователи, занимающиеся изучением противоопухолевой активности полисахаридов выделенных из мицелия ряда базидиомицетовых грибов, в 1970-х гг. выявили противоопухолевую активность полисахаридов полученных из мицелия лиственничной губки в отношении солидной опухоли саркома-180. Данные подтверждены результатами современный исследований в отношении цитотоксического действия экстрактов мицелия *F. officinalis* на клетки карциномы Эрлиха [87].

Другой представитель этого рода – *Fomitopsis pinicola* – трутовик окаймленный – благотворно действует на легкие и желудок, проявляет кровоостанавливающее и седативное действие, противоопухолевые свойства [55]. В народной медицине отвар данного гриба использовался в качестве слабительного средства, а также средства для лечения лихорадки, дизентерии, желтухи [178].

Базидиомицет вида *F. pinicola* – очень популярный лекарственный гриб в Китае. Им лечат такие заболевания как рак, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет. Исследования показали, что хлороформный экстракт *Fomitopsis pinicola* содержит эргостерол и проявляет аппопоптозный эффект на раковые клетки [257]. Водные и спиртовые экстракты, полученные из базидиомицетов данного вида увеличивают аппопоптоз раковых клеток и уменьшают их размер до 54 % [260].

Изучение противовирусных свойств водных и спиртовых экстрактов базидиомицета трутовика окаймленного в перевиваемой линии клеток *Vero*

показало их активность в отношении ДНК-содержащих вирусов (осповакцины, оспы мышей и простого герпеса 2-го типа). Показано, что все экстракты, проявившие выраженную активность, содержат каротиноиды и тритерпены.

В состав грибов данного вида входят вещества, воздействующие на центральную нервную систему. *F. pinicola* содержит ингибиторы эндопептидаз, действие которых сравнимо с действием опиоидов и обладающих высокой избирательностью, и могут быть полезны в лечении болевых синдромов.

Кроме того, показано, что экстракты из плодовых тел и культуральные фильтраты *Fomitopsis pinicola* снижают активность клеток поджелудочной железы при сахарном диабете. Полученные данные можно применять при разработке функциональных продуктов питания, для людей страдающих диабетом [92, 93].

Данный вид нашел широкое распространение в промышленности. На основе штаммов *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst (ATCC 20036) и *Irpex lacteus* Fr (IFO 5367) получают молокосвертывающий ферментный препарат [90]. Кроме того, в сыроделии используются протеиназы, выделенные из данного вида, для замены сычужных ферментов. Исследования показали, что *Fomitopsis pinicola* является продуцентом ферментов лакказ, которые широко применяются в промышленности, что открывает перспективы для использования данного вида в новых областях [217].

1.3.2 Использование грибов рода *Trametes*

Базидиальные грибы рода *Trametes* широко использовались народной медициной Японии и Китая в виде настоев порошка плодовых тел. В настоящее время высокоочищенные экстракты плодовых тел, содержащие полисахариды, известны как препараты, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью, усиливающие клеточный иммунитет, обладающие антиметастатической активностью и снижающие гематологическую супрессию, вызываемую противоопухолевыми лекарствами,

а также эффективные при заболеваниях печени различной этиологии [85, 157, 163, 179, 184, 190, 214, 240, 251].

Кроме того, грибы рода *Trametes* нашли широкое применение в различных отраслях промышленности: на их основе разрабатываются экологически чистые безотходные технологии получения лекарственных препаратов различного назначения, пищевых добавок, стимуляторов роста животных, а также современных способов утилизации отходов деревоперерабатывающей, текстильной и сельскохозяйственной промышленности [167].

В России на основе грибов рода *Trametes* создана лечебно-профилактическая пищевая добавка «Трамелан». Трамелан представляет собой таблетированную форму монокультуры высшего лекарственного гриба рода *Trametes*, выращенного биотехнологическим путем с добавлением органического цинка. Основные направления терапевтического действия этого препарата – онкостатическое (достоверное снижение онкомаркеров: раково-эмбрионального антигена (РЭА), ферритина, накапливающегося при опухолях пищеварительной системы, карбогидратного антигена (СА-125), сопряженного с опухолями яичников, и мусциноподобного антигена (МЦА), рост которого выявляется при опухолях молочной железы) и гепатопротекторное (повышение дезинтоксикационной функции печени). Получены клинические данные о нормализующем влиянии препарата на клеточный иммунитет организма и, в частности, на количество и соотношение Т- и В-лимфоцитов [24]. Эффективность препаратов клинически подтверждена также при заболеваниях печени различной этиологии [25, 27, 188]. Изучен химический состав и препарат сертифицирован как пищевая добавка [28].

В Иркутском филиале института ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН с использованием современных методов биотехнологии на основе базидиального гриба *Coriolus pubescens* был разработан препарат «Леван-2», обладающий антимикробной активностью в отношении референтных штаммов микроорганизмов и штаммов, выделенных от больных

животных из родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* [121].

При экспериментальном моделировании туберкулезной инфекции было установлено, что данный антимикробный препарат, обладает и противотуберкулезной активностью в дозе 2,0 мл/кг массы тела лабораторной мыши при введении внутримышечно. Монотерапия препаратом приводит к излечению животных и увеличению массы их тела. Обнаруженная активность препарата сравнима с активностью широко известных туберкулостатиков [122, 124].

Медицинское использование *T. versicolor* начиналось с изучения полисахаридбелкового комплекса, выделенного из мицелия, с целью получения лекарства против некоторых форм рака. Большинство клинических исследований проводились с протегликановыми экстрактами, и их эффективность в лечении рака подтверждается внушительным количеством клинических доказательств. Они показывают впечатляющие результаты в борьбе с различными видами онкологии, включая рак желудка, пищевода, кишечника, легких и молочной железы [249].

В 1970-х гг. японскими и китайскими исследователями как из плодовых тел гриба *T. versicolor* (известного в Китае как *Yun-Zhi* и *Kawaratake*, в Японии), собранных в природе, так и из мицелия различных штаммов *T. versicolor*, полученного путем погруженного культивирования, первоначально был получен полисахаропептид (PSP). Спустя 10 лет – на основе полисахаропептида был получен и клинически изучен препарат биотехнологической фирмы «Sankyo» «Крестин» (Япония), который зарекомендовал себя как эффективный и, что особенно важно, малотоксичный онкостатик при поддерживающей терапии раковых заболеваний, снижающий также гематологическую супрессию, вызываемую другими противоопухолевыми лекарствами, а также как нервоуспокаивающее и болеутоляющее средство [152, 162, 169, 186, 213, 238]. PSK повышает иммунный статус и продлевает жизнь при раке пищевода, желудка, кишечника, легких, матки, простаты и молочной железы, в сочетании

со стандартной противораковой терапией [151, 206. 208, 230, 242, 252, 259]. Современные методы исследования помогли обнаружить новый белок TVC, обладающей иммунустимулирующей активностью [197].

В экспериментах *in vitro* было установлено, что PSK обладает анти-ВИЧ активностью: подавляет обратную транскриптазу ВИЧ; ингибирует связь вируса с лимфоцитами; ингибирует передачу вируса ВИЧ-1 и ВИЧ-2 от клетки к клетке. При использовании добавки биомассы *Trametes versicolor* в количестве 3,0 г в день у больных ВИЧ наблюдается улучшение иммунного статуса. Кроме того, клинические исследования по применению PSK показали положительный стабильный эффект у пациентов с вирусом папилломы человека [165].

Южнокорейский аналог PSK – «Copolang», китайский аналог «IPPV» и другие препараты полисахаридной природы, полученные из базидиомицетов рода *Trametes* широко используются в онкологии при лечении рака [6].

Установлена противовирусная активность вида *T. versicolor* в отношении гриппа А и герпеса 2-типа, а также определен высокий терапевтический индекс - 324,7, в связи с чем, трутовик разноцветный можно рекомендовать для фармацевтической промышленности, в качестве противогриппозного и противогерпетического агента с низкой токсичностью [193].

1.4 Культивирование базидиальных грибов, методы стимулирования роста

Плодовые тела высших базидиомицетов являются важными источниками биологически активных веществ, но, в связи с тем, что их сбор в природных условиях зависит от множества неконтролируемых факторов, таких, как погодные условия, сезонность, техногенное загрязнение окружающей среды, они не могут служить стабильной основой для производства биологически активных добавок на их основе [8, 98]. Биологически активные вещества содержатся не только в базидиомах высших грибов, но и в вегетативном мицелии гриба, поэтому актуально получать биомассу в активными

соединениями путем жидкофазного и/или твердофазного культивирования. Поэтому получение биомассы мицелия с помощью современных биотехнологических методов имеет ряд важных преимуществ: экологическая чистота получаемых препаратов, неограниченная возможность производства, многообразие и дешевизна сырьевых ресурсов и безотходность производства [209].

1.4.1 Традиционные питательные среды и условия культивирования

Одним из основных показателей, влияющих на рост базидиальных грибов, является состав питательной среды [4, 69, 105]. Высшие грибы обладают активными полиферментными системами и могут быть агентами биоконверсии большого числа субстратов и способны усваивать непищевые сахара, такие как пентозы, галактозы, полисахариды типа гемицеллюлоз, клетчатку и даже лигнин, в том числе и гидролизный, поэтому использование дереворазрушающих грибов в качестве продуцентов биологически активных веществ перспективно. Это расширяет возможность утилизации разного рода непищевого сырья в качестве питательных сред для их культивирования, а также решает проблему безотходных технологий [18, 99].

Рост мицелиальной культуры грибов зависит не только от состава питательной среды, но и от условий культивирования. Факторами, регулирующими и влияющими на рост и метаболизм высших базидиомицетов в культуре, являются температура, влажность субстрата, pH питательной среды, аэрация [1, 4, 26].

Оптимальное значение температуры – важный показатель условий жизни грибов, причем для различных частей грибного организма (мицелия, спор, плодовых тел) оно не одинаково, поэтому наиболее гармоничное течение обменных процессов наблюдается при температурном оптимуме. Для большинства грибов нижний предел, при котором прекращается рост клеток, —

0—3°С, а верхний — не превышает +40°С. Однако, отсутствие роста у грибов при температуре ниже нуля не означает их гибель [77].

Другим не менее важным условием культивирования является свет. У грибов различных таксономических групп обнаружена регуляторная система, названная микохромной, по аналогии с фитохромной системой у высших растений. Большинство грибов, у которых установлено присутствие микохромных систем, имеют пигменты каротиноидной и меланиновой природы. Исследованиями ряда авторов, по изучению влияния света в видимой части спектра на рост и биосинтетическую активность разных видов высших грибов, показано, что облучение в определенных режимах стимулирует прорастание спор, улучшает рост вегетативного мицелия, способствуя формированию более мощного и активного мицелия, сокращает фазы развития грибов и ускоряет сроки плодоношения, увеличивает активность биологических продуктов мицелия [5, 16, 77, 94].

Определяющим фактором при жидкофазном и твердофазном культивировании мицелия высших грибов являются условия аэрации. Также важным показателем является влажность субстрата при твердофазном культивировании [110].

1.4.2 Исследования физических методов по ускорению роста базидиомицетовых грибов

Основными усложняющими работу причинами при культивировании базидиомицетов является инфицирование сред и медленный рост мицелия. Для устранения инфицирования используют антибиотики, а для увеличения скорости роста – различные физико-химические и химические методы.

Свет является одним из важнейших физических факторов для живых организмов на Земле. Для большинства макромицетов он служит морфогенетическим фактором, хотя они и не относятся к фототрофным организмам. Благоприятное действие видимого света известно давно, но

применение воздействия света для использования при стимулировании роста продуцентов в лабораторных и промышленных условиях изучено мало. Однако, в последнее время стали проводиться исследования по применению лазерного облучения в биотехнологии базидиомицетов [15, 224-227].

По мнению некоторых авторов за эффекты, наблюдаемые при лазерном облучении, ответственны такие свойства, как поляризация света и импульсный характер лазерного излучения. Однако, позитивное и стимулирующее действие излучения, проявляющееся при узком интервале интенсивностей, может исчезнуть или даже смениться угнетающим эффектом.

Существует несколько разных механизмов действия лазерного света: фотодинамическое действие лазерного излучения на биологические мембраны (окислительное повреждение различных биологических структур в результате их облучения в присутствии поглощающих свет веществ (хромофоров), называемых фотосенсибилизаторами); фотореактивация супероксид-дисмутазы (воздействие на ферменты - железо- и медь- содержащие ферменты, такие как каталаза, цитохром-оксидаза, Cu- Mn- супероксид-дисмутаза (Cu-Zn-СОД) и церулоплазмин); фотолиз соединений содержащих NO, которые активно реагируют с геминовыми соединениями.

У грибов можно также выделить светочувствительные системы на молекулярном уровне: чувствительность к синему свету обеспечивается фоторецептором на основе флавина, который сам действует как передающий источник; чувствительность к красному свету реализуется с помощью фитохрома [227]. Селективное воздействие света на электроны фоточувствительных структур, фоторецепторы и внутриклеточные процессы у базидиомицетов является причиной целенаправленного воздействия лазера на внутриклеточные процессы и регулирование процессов биосинтеза, что позволит получать культуры с высокой биологической активностью и повышенным содержанием ценных веществ и метаболитов.

Свет в видимой части спектра используют при глубинном культивировании мицелиальных грибов в качестве перспективного

экологически чистого регуляторного фактора [23]. Так, например, инфракрасные лучи применяют для усиления роста культур лекарственных грибов *Coriolus vaporarius* и *Serpula lacrimans.* В то же время, практическое использование монохроматического света в биотехнологических процессах ограничено из-за отсутствия сведений, четко определяющих механизмы действия света, эффективные длины волн и режимы облучения [15].

В результате исследований установлено, что свет влияет на скорость прорастания спор – достаточно длинный и трудоемкий процесс, даже у видов с низкой способностью к прорастанию, например лазерное облучение в красной части спектра активизирует процесс активации базидиоспор *H. erinaceus* почти в 10 раз [96, 97].

Показано, что низкоинтенсивный свет повышает ростовой коэффициент исследуемых видов *Lentinus edodes, Pleurotus ostereatus* и *Hericium erinaceus* за счет формирования более обильного мицелия, а также стимулирует образование примордий. Облучение когерентными источниками света (HeNe- и аргоновый лазеры) позволяет увеличить выход биомассы на жидкой среде вида *G. lucidum* до 11 % при стационарном культивировании и до 19 % при глубинном. Для оценки перспектив применения лазерного излучения в промышленном производстве были проведены исследования по влиянию HeNe- и аргонового лазерного излучений на колонизацию субстрата и плодоношение базидиомицетов видов *P. ostreatus, L. edodes* и *H. erinaceus*. Показано, что облучение способствует сокращению периода, предшествующего плодоношению, и сроков плодоношения, также наблюдается значительное увеличение урожайности плодовых тел [95, 223].

Кроме световых волн в качестве стимуляторов можно использовать акустические волны в слышимом диапазоне частот.

Проведены многократные исследования по оценке эффективности акустического воздействия в широком диапазоне частот на биологические объекты [52-54, 164]. Наиболее подробно изучено воздействие ультразвука (УЗ) с малой интенсивностью, когда мощность воздействия не превышает 2

Вт/см^{2}в диапазонах частот 20-66 кГц и 0,5-10 МГц [7, 129, 133, 201]. Показано, что УЗ низкой интенсивности улучшает воспроизводительные функции клеток семян, при этом увеличивается урожайность растений, структуру биомембран, способствуя их проницаемости, в то время как УЗ высокой интенсивности приводит к необратимым негативным изменениям, например распаду питательных веществ, снижение роста, изменение морфологии [3, 126]. На производстве УЗ применяют для стимуляции различных технологических процессов, таких как стерилизация, эмульгирование [51].

Кроме того последнее время проводятся исследования по увеличению продуктивности и антиоксидантной активности высших базидиомицетов, например, таких как *Phellinus igniarius,* при помощи УЗ [264].

Влияние акустических волн в слышимом диапазоне частот не так глубоко изучено, однако, представляет научный интерес в связи с результатами исследований, которые появляются последнее время. Установлено, что воздействие волн в данном диапазоне на семена двукисточника тростникового приводит к улучшению прорастания семян, приросту фитомассы. Данный способ обработки можно рассматривать как перспективный для повышения продуктивности растений [127, 128]. Кроме того, акустическую обработку можно применять и к ферментным препаратам, например, «Пепсин говяжий», который используется в технологии сычужных сыров и проявляет чувствительность к частотам в диапазоне 250-2000 Гц. Исследования показали, что применение акустической обработки низкой мощности для протеолетических ферментных препаратов является эффективным и представляет практическую значимость при производстве творога, брынзы, мягких сыров [51].

Таким образом, следует отметить, что приведенные выше сведения свидетельствуют о значимости промышленного получения мицелия видов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* для использования, как в качестве противомикробных активных добавок для пищевой промышленности.

На основании выше изложенного, можно прийти к заключению, что штаммы видов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* – перспективные объекты исследований в области биотехнологии, содержащие в своем составе ряд ценных и биологически активных веществ.

Однако, на сегодняшний день отсутствует достаточное количество источников, дающих информацию о противомикробной активности штаммов базидиомицетов видов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также антагонистических свойствах в отношении микромицетов рода *Penicillium,* вызывающих порчу и плесневение пищевых продуктов. Это приводит к необходимости исследования изолятов базидиомицетов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor*: изучению их морфолого-культуральных и физиологических свойств; биохимического состава, а также переваримости мицелия базидиомицетов; определение ферментативной активности штаммов.

Следует отметить и приоритет определения условий культивирования, влияющих на ростовые показатели и выход биомассы, накопление биологически активных соединений, так как по литературным данным большинство видов базидиомицетов относятся к медленнорастущим грибам. В связи с этим является также актуальным оценка возможности стимуляции роста базидиомицетов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor,* с помощью облучения когерентным и некогерентным светом и акустическими волнами в слышимом диапазоне частот.

Необходимо также отметить важность разработок в направлении получения функциональных пищевых добавок и полимерных покрытий пищевых продуктов на основе базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes,* обладающих противомикробной активностью.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Характеристика изучаемых штаммов из родов *Fomitopsis* и *Trametes*

Базидиомицетовые грибы: трутовик лекарственный (лиственничная губка) – *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., трутовик окаймленный – *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. и трутовик разноцветный – *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd – известны как продуценты ряда биологически активных соединений. Систематическое положение изучаемых грибов: Царство *Fungi*, Отдел *Basidiomycota*, класс *Basidiomycetes*, Подкласс *Homobasidiomycetidae*, порядок *Polyporales (Poriales)*. Виды *Fomitopsis officinalis* и *Fomitopsis pinicola* относятся к семейству *Fomitopsidaceae*, подсемейства *Gloeophylloideae*, роду *Fomitopsis;* вид *Trametes versicolor* относится к семейству *Polyporaceae (Poriaceae)*, подсемейства *Trametoideae*, род *Trametes* [11, 20, 149].

В течение длительного периода времени 18 штаммов, выделенные из плодовых тел базидиомицетов *Fomitopsis* и *Trametes* пораженных древостоев республики Тыва и Красноярского края, были собраны в коллекции культур Московского государственного университета прикладной биотехнологии (ныне Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП): http//www.ftacademy.ru/UserFiles/UO/material/view_print.php?id=60&pass=YWFh.

Согласно данным авторов, проводивших исследования с коллекцией, ряд штаммов показали высокую биологическую активность в отношении опухолевых клеток и грамположительных бактерий [49, 103]. Эти штаммы представляли интерес и послужили объектами предпринятых нами исследований:

- Штаммы 12/91 (1991 г.), 03/99 (1999 г.), 11/05 (2005 г.), 01/06 (2006 г.), 02/06 (2006 г.) и В 08/06 (2006 г.) (ВКПМ F-1024) - выделены из плодовых тел базидиомицета *Trametes*;

- Штаммы Fp-04 (1994 г.), Fp-04/99 (1999 г.), Fp-11/2 (2002 г.), Fp-02/06 (2002 г.), Fp-04/06 (2004 г.), Tyv-5/shag-4 (2005 г.), Tyv-2006/bal-2 (2006 г.), Tyv-6/bal-4 (2006 г.), Tyv-6/bal-5 (2006 г.), Tyv-6/bal-11 (2006 г.), Tyv-6/shag-3 (2006 г.) и Tyv-2006 (2006 г.) (ВКПМ F-961) - выделены из плодовых тел базидиомицета - *Fomitopsis*.

В качестве тест-объектов для оценки противобактериальной активности были использованы коллекционные штаммы условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, принадлежащие коллекции Научно-исследовательского центра «Биотест»*: Bacillus coagulans* 429*, Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* 766, *Staphylococcus aureus* 6538-P, *Escherichia coli* M 17, а также дрожжеподобный гриб *Candida albicans*.

В качестве тест-объектов для оценки противоплесневой активности были использованы штаммы микромицетов рода *Penicillium*, выделенные в ходе многолетних исследований д.т.н. Л.С. Кузнецовой и принадлежащие коллекции культур МГУПП:

1. Штамм *P. brevicompactum* F-4481, выделенный с оболочки в/к колбасы "Сервелат" (ООО "Нива", г. Москва),
2. Штамм *P. roqueforti* F-4484, выделенный с поверхности сыра "Швейцарский" (ООО "Пир-ПАК", Московская обл.),
3. Штамм *P. commune* F-4486, выделенный с поверхности сыра "Советский" (ООО "Пир-ПАК", Москвская обл.),
4. Штамм *P. nalgiovense* F-4492, выделенный с оболочки с/к колбасы "Пикантная" (ООО "Микоян", г. Москва);
5. Штамм *P. polonicum* F-4497, выделенный из воздуха камеры по хранению готовых колбас (ООО "Нива", г. Москва).

2.2 Методы исследования

Выбор методов исследования был обусловлен поставленными задачами работы. В работе были использованы классические методы изучения

морфологии, физиологии и биохимического состава мицелия; методы изучения структуры мицелия, противомикробной активности в процессе роста штаммов изучаемых видов. Важным, на наш взгляд, было проведение исследований по стимулированию роста мицелия методами облучения когерентным и некогерентным светом и акустическими волнами в слышимом диапазоне частот.

2.2.1 Изучение противомикробной активности метаболитов водных и спиртовых экстрактов мицелия

Противомикробную активность культурального фильтрата, водных и спиртовых экстрактов из мицелия базидиомицетов, содержащих продукты метаболизма, изучали методом дисков. В качестве тест-культур использовали условно-патогенные и патогенные микроорганизмы и микроскопические грибы рода *Penicillium*, вызывающие порчу пищевых продуктов.

Для получения мицелиальной массы и культурального фильтрата штаммы культивировали на жидкой питательной среде Maltax 10, имеющей следующий состав: Maltax 10 – 50 г, вода – 1000 мл при температуре 27±1°С в течении 14 суток. Биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости фильтрованием. Мицелий штаммов высушивали в сушильном шкафу ТС-80-01 при температуре 40±1°С до постоянной массы, после чего проводили водную горячую экстракцию и спиртовую экстракцию мицелия штаммов, полученного в результате поверхностного жидкофазного культивирования. Водные экстракты из биомассы измельченного мицелия получали путем смешивания дистиллированной воды и измельченной биомассы (1:30) при температуре 60±1°С на качалке при 120 об./мин. в течение пяти часов. Полученные экстракты для освобождения от возможной бактериальной микрофлоры дополнительно фильтровали. Спиртовые экстракты получали путем экстрагирования образца 96 %-ным спиртом с соотношением образца к экстрагенту 1:10. Полученные экстракты и культуральные фильтраты очищали

от нежелательной микрофлоры фильтрованием через мембранный фильтр фирмы «Владипор».

Тест-культуры микроорганизмов выращивали в пробирках со скошенным питательным агаром в течение суток. После чего культуру микроорганизмов суспензировали в физиологическом растворе до мутности 0,5 по стандарту McFarland ($1,5x10^8$ КОЕ/мл) и использовали в течение 15 минут. В чашки Петри разливали среду - индивидуальную для каждой тест-культуры. Инокуляцию культуры на чашку осуществляли штрихами в 3-х направлениях под углом 60º, каждый раз поворачивая чашку вокруг своей оси. В заключение делали несколько вращательных движений тампоном по краям агаровой пластинки. После чего на агар с посевами раскладывали диски размером 15х15 мм. Посевы инкубировали в термостате ТС-80М-2 при температуре 37±1ºС в течение суток.

Учет результатов проводили путем измерения диаметра зон подавления роста тест-культуры микроорганизмов миллиметровой линейкой. Полученные результаты интерпретировали следующим образом: « - » – активности нет; до 12 мм – слабая чувствительность; от 13 до 29 мм – средняя чувствительность; 30 мм и более – высокая чувствительность [56].

2.2.2 Изучение миколитической активности штаммов

Миколитическую активность исследуемых штаммов изучали методом встречных культур на твердых агаризованных средах в отношении токсинобразующих тест-объектов рода *Penicillium*.

В чашку Петри со средой Maltax 10 (состав: Maltax 10 – 50 г/л; агар 20 г/л), с одной стороны высевали штрихом исследуемый штамм базидиомицета, с другой на расстоянии 50 мм высевали штрихом микромицеты рода *Penicillium*. Эксперимент проводили в двух параллельных повторностях: в первой производили одновременное инокулирование; во второй – поэтапный подсев микромицетов рода *Penicillium* к исследуемым штаммам, культивируемым на протяжении 3 суток, что обусловлено медленным ростом исследуемых

штаммов базидиомицетов. Инкубирование культуры проводили в термостате типа ТС – 1 СПУ при температуре 27±1ºС в течение всего срока наблюдения. Учеты проводили ежедневно, отмечая характер взаимоотношений гриба и плесени: наличие или отсутствие зон, изменение цвета, плотности, толщины и направления роста мицелия микромицета [71].

2.2.3 Молекулярно-генетические исследования штаммов

Для подтверждения видовой принадлежности использовали молекулярно-генетические исследования. Исследовали участок ядерной рДНК, содержащий транскрибируемый спейсерный участок ITS. Для анализа хроматограмм, полученных после секвенирования, использовали программу Chromas Pro Sequence Scanner. Для поиска гомологичных последовательностей в Генбанке – программу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Исследования проводили на базе кафедры «Микологии и альгологии» МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством и консультациях профессора, доктора биологических наук А.В. Шныревой, за что автор выражает огромную благодарность.

2.2.4 Изучение морфолого-культуральных особенностей и показателей роста штаммов на различных питательных средах

Для определения ростовых признаков исследуемые штаммы культивировали на агаризованных питательных средах следующего состава:

Грибной агар – свежие съедобные грибы - 50,0 г, крахмал водорастворимый - 5,0 г, агар - 20,0 г, вода - 1000мл;

Капустный агар №1 – экстракт отваренной капусты – 200,0 мл, Maltax 10 – 5,0 г, кукурузная мука - 2,5 г, агар- 20,0 г, вода - 800 мл;

Капустный агар №2 – экстракт отваренной капусты – 200,0 мл, глюкоза - 20,0 г, пептон - 10,0 г, карбонат кальция – 10,0 г, агар - 20,0 г, вода - 800 мл;

Картофельно-декстрозный агар – экстракт отваренного картофель (неочищенный, с белой кожурой) – 200,0 мл, декстроза - 20,0 г, агар - 20,0 г, вода – 800 мл;

Картофельный агар – экстракт отваренного картофель (неочищенный, с белой кожурой) - 200,0 мл, агар - 20,0 г, вода – 800 мл;

Мальт-дрожжевой агар - агар - 12,0 г, Maltax 10 - 12,0 г, дрожжи - 1,0 г, отруби - 0,5 г, опилки - 4,0 г, вода - 1000 мл;

Морковный агар – экстракт отваренной моркови – 400,0 мл, агар 15,0 г, вода 600 мл;

Овсяный агар - овсяная мука (геркулес) – 20,0 г, агар – 20,0 г, вода-1000мл;

Среда с гороховой мукой - гороховая мука - 10,0 г, карбонат кальция - 1,0 г, глюкоза- 10,0 г, хлорид натрия - 5,0 г, агар - 30,0 г, вода - 1000 мл;

Среда Сабуро – пептон - 10,0 г, глюкоза - 40,0 г, агар - 20,0 г, вода 1000мл;

Среда Чапека – глюкоза – 20,0 г, сульфат магния - 0,5 г, хлорид калия - 0,5 г, карбонат кальция - 3,0 г, гидроортофосфат калия - 1,0 г, сульфат железа - 0,1 г, агар - 20,0 г, вода – 1000 мл;

Среда Maltax 10 с добавлением 1 % лиственничных опилок – Maltax 10 – 50,0 г, агар – 20,0 г, лиственничные опилки – 10,0 г, вода - 1000 мл;

Среда Maltax 10 с добавлением 3 % лиственничных опилок – Maltax 10 – 50,0 г, агар – 20,0 г, лиственничные опилки – 30,0 г, вода - 1000 мл;

Среда Maltax 10 с добавлением 5 % лиственничных опилок – Maltax 10 – 50,0 г, агар – 20,0 г, лиственничные опилки – 50,0 г, вода - 1000 мл;

Среда Maltax 10 с молочной сывороткой - Maltax 10 – 50,0 г, агар – 20,0 г, молочная сыворотка – 40,0 г, вода – 1000 мл.

Питательные среды разливали в чашки Петри по 20 мл. С целью стандартизации посевов в качестве инокулюма использовали прямоугольные блоки размером 15×15 мм, вырезанные скальпелем из зоны роста семисуточной культурой соответствующего штамма. Инкубирование культуры проводили в

термостате типа ТС – 1 СПУ при температуре 27±1ºС в течение всего срока наблюдения. Каждые сутки измеряли диаметр разрастания колоний и наблюдали за их культурально-морфологическими признаками (текстура и форма колоний, пигментация мицелия, наличие экссудата и др.), плотностью и высотой воздушного мицелия.

Суточную линейную скорость роста (СР) культуры вычисляли по формуле (1):

$$СР=\frac{D-d}{2\times t} \quad (1),$$

где D – диаметр колонии, мм; d – диаметр инокуляционного блока, мм; t – время культивирования, сут.

Ростовой коэффициент (РК) вычисляли по формуле (2):

$$PK=\frac{(D-d)\times h\times g}{t} \quad (2),$$

где D – диаметр колонии, мм; d – диаметр инокуляционного блока, мм; h – высота колонии, мм; g – плотность колонии, баллы; t – возраст колонии, сут.

Штаммы, в зависимости от значений ростовых коэффициентов, условно делили на быстрорастущие (РК>100), растущие со средней скоростью (РК=50-100) и медленнорастущие (РК<50) [16].

Изучение микроморфологических особенностей штаммов

Микроморфологию ядер изучали с использованием люминесцентной микроскопии, для чего 7, 14 и 21-суточный мицелий фиксировали в модифицированном растворе Карнуа с последующим окрашиванием реактивом ДАПИ (4',6-диамидино-2-фенилиндол, SIGMA) в концентрации 500 нг/мл; в работе использовали микроскоп Axioskop 40 FL, фильтр 02 (Zeiss, Германия).

Для изучения микроморфологии бластоконидий использовали сканирующую электронную микроскопию. Агаровые блоки с наросшим 7, 14 и 21-суточным мицелием фиксировали в парах осмия. После высушивания образцы закрепляли, напыляли смесь платины и палладия (IB-3 Ion Coater) и просматривали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-405A (Япония). Исследования проводили в лаборатории электронной

микроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова, за что автор выражает огромную благодарность профессору, доктору биологических наук О.В. Камзолкиной.

2.2.5 Подбор растительных субстратов для твердофазного культивирования базидиомицетов

Для изучения возможности получения мицелия путем твердофазного культивирования в качестве растительных субстратов использовали опилки лиственничных пород деревьев, солому, подсолнечную лузгу, отруби, кукурузную муку, пшено, которые значительно отличаются от агаризованных питательных сред и характеризуются высоким содержанием клетчатки, гетерополисахаридов и лигноподобных соединений [99, 100]. Колонизация такого субстрата грибами является важным показателем для разработки рекомендаций промышленного получения мицелиальной массы грибов.

Исходное сырье измельчали на лабораторном измельчителе шнекового типа, для исследований использовали сырье размером 4,5-5,0 мм [18]. После чего субстраты увлажняли дистиллированной водой. Стерилизацию субстратов осуществляли в автоклаве DGM-200 при 1 атмосфере в течение часа трижды. С целью стандартизации посевов в качестве инокулюма использовали прямоугольные блоки размером 15×15 мм, вырезанные скальпелем из зоны роста семисуточной культурой соответствующего штамма. Инкубирование культуры проводили в термостате типа ТС – 1 СПУ при температуре 25±1ºС в течение всего срока наблюдения. Учет результатов проводили путем ежедневного измерением диаметра колонии гриба и визуальной оценки формирования воздушного мицелия [16].

2.2.6 Изучение динамики накопления биомассы

Изучение динамики накопления биомассы штаммами базидиомицетов проводили путем поверхностного и погруженного жидкофазного культивирования на среде Maltax 10 (4°Б) при температуре 25±1ºС в

плоскодонных колбах ёмкостью 250 мл без перемешивания и с перемешиванием на лабораторном шейкере, соответственно. В качестве инокулюма использовали блоки 10×10 мм, вырезанные скальпелем из зоны роста семисуточной культуры соответствующего штамма. Инкубирование культуры проводили в термостате типа ТС – 1 СПУ при температуре 25±1ºС в течение всего срока наблюдения. Оценку динамики накопления биомассы проводили весовым методом на 7, 10 ,14, 21, 28, 35, 42-е сутки культивирования. Пленки и биомассу культуры, выращенные поверхностным и погруженным способом на жидкой среде, высушивали в термостате при температуре 40±1°С до постоянной массы.

2.2.7 Исследование ферментативной активности

Определение хитиназной активности

Для определения хитиназной активности штаммов культуральную жидкость, полученную после культивирования в течение 14 суток, отфильтровывали. К 0,3 мл суспензии коллоидного хитина (10 мг/мл) последовательно добавляли: 0,1 мл 0,5 М натрий ацетата - уксусной кислоты (pH 5,5), аликвоту анализируемого образца культуральной жидкости, воду до конечного объема 1,0 мл и инкубировали при температуре 37±1°С в течение 15 минут. Для определения активности хитиназы в полученных культуральных жидкостях микроорганизмов использовали динитросалициловый (ДНС) метод, основанный на определении активности фермента по количеству образующихся в результате реакции редуцирующих сахаров с коллоидным хитином в качестве субстрата. Количество восстанавливающих сахаров определяли путем регистрации оптической плотности на ФЭКе КФК-2 при длине волны 420 нм. Полученные значения переводили по калибровочной кривой, построенной с известными концентрациями глюкозы. За единицу хитиназной активности принимали такое количество фермента, которое в

описываемых условиях реакции вызывает прирост концентрации глюкозы на 1,0 мкмоль/мин$^{-1}$*мл$^{-1}$ [82].

Определение целлюлазной активности

Для определения целлюлазной активности в колбу с 1 мл культуральной жидкости добавляли 49 мл дистиллированной воды. После чего нарезали полоски бумаги размером 1,5×8 см и складывали их «гармошкой», которую помещали в пробирки и заливали 2 мл дистиллированной водой. В качестве контроля использовали 3 пробирки с дистиллированной водой. Все пробирки помещали в водяную баню при температуре 100±1ºС на 15 минут. Затем в каждую пробирку приливали по 2 мл раствора культуральной жидкости и ставили в водяную баню при 100±1ºС на 1 час. К 1 мл гидролизата добавили 3 мл ДНС и нагревали на водяной бане при 100±1ºС 15 минут. После чего определяли плотность образцов на ФЭКе КФК-2 [82].

2.2.8 Исследование биохимического состава мицелия штаммов базидиомицетов

Изучение биохимического состава мицелия базидиомицетов проводили по классическим методам по следующим параметрам: общее количество белка, аминокислотный состав, содержание углеводов и глюканов, массовую долю золы.

Определение содержания общего белка и аминокислотного состава

Определение общего белка проводили по методу Кьельдаля на анализаторе Кьельтек (Foss, Дания), который включает в себя систему мокрого сжигания. Содержание азота (N), мг/100 г сухого вещества рассчитывали по формуле (3):

$$N=\frac{(V_n-V_k)\times 0{,}1\times 14{,}007\times 6{,}25}{m_п\times w}*100 \quad (3),$$

где $V_п$ – объем пробы, мл; $V_к$ – объем контроля, мл; 0,1 – нормальность раствора гидроксида натрия, моль*экв/л; 14,007 – молярная масса атома азота, г/моль; 6,25 – среднее содержание азота в белке, %; $m_п$ – масса пробы, 10^{-3}г; w - содержание сухих веществ, %.

Изучение качественного и количественного состава аминокислот проводили методом ионообменной хроматографии на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik LC 2000 (Германия).

Точную навеску образца массой 10,0 мг растирали в фарфоровой чашке с 5 мл 6Н соляной кислоты, содержащей 1 мг/мл натрий-соли меркаптоэтансульфоновой кислоты, для предотвращения разрушения метионина (для определения цистеина в 6 Н соляную кислоту добавляли 0,2 М диметилсульфоксид). Полученный гомогенат количественно переносили в пробирку-ампулу. После чего удаляли воздух из ампул продувкой инертным газом-азотом, запаивали ампулы, ставили в термостат при температуре 103-105ºС и гидролизовали в течение 24 часов, периодически встряхивая содержимое ампул. После окончания гидролиза ампулы охлаждали, вскрывали и содержимое количественно переносили в фарфоровые чашки. Чашки с гидролизатом выпаривали досуха на водяной бане при температуре не более 50±1ºС в вытяжном шкафу, после чего в чашки добавляли немного дистиллированной воды, затем снова выпаривали досуха. Эту операцию повторяли 3-4 раза.

После удаления соляной кислоты сухой остаток растворяли в 2 мл свежеприготовленного 0,2 М натрий-цитратного буфера (рН 2,2), затем к 0,5 мл полученного раствора прибавляли 2 мл 0,2 М натрий-цитратного буфера (рН 2,2) и 0,2 мл полученного раствора вводили на аналитическую установку аминокислотного анализатора. На выходе из аналитической колонки разделенные аминокислоты смешивались с нингидриновым реактивом в смесительном блоке. После чего производилось непрерывное и одновременное колориметрическое измерение окрашенных комплексов при двух длинах волн: при длине 570 нм – первичным аминов, образующих пурпурную окраску; при 440 нм – вторичных аминов, образующих соединения желтой окраски.

Качественный состав аминокислот осуществляли по временам удерживания. В качестве стандарта использовали смесь, состоящую из 24 аминокислот.

Количественное содержание обнаруженных аминокислот рассчитывали в мг на 100 г абсолютно сухого мицелия [61].

Определение содержания углеводов

Содержание легко- и трудногидролизуемых полисахаридов в мицелии устанавливали с использованием метода Кизеля и Семигановского, основанном на реакциях гидролиза полисахаридов исследуемой пробы с последующим нахождением общего количества образовавшихся моносахаров по редуцирующей способности эбулиостатическим методом [116].

Определение легкогидролизуемых полисахаридов

Навеску образца около 5 г, взвешенную с точностью 0,002 г, помещали в коническую колбу вместимостью 500 мл, приливали 200 мл 2 %-ного раствора соляной кислоты. Затем колбу ставили на кипящую водяную баню с обратным холодильником. Через 3 часа нагревание прекращали, содержимое реакционной колбы фильтровали на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывали горячей водой до отрицательной реакции на кислоту и сохраняли для определения в нем трудногидролизуемых полисахаридов.

Фильтрат и промывные воды соединяли вместе в мерной колбе вместимостью 500 мл и доводили объем дистиллированной водой до метки. Полученный раствор гидролизата легкогидролизуемых полисахаридов после тщательного перемешивания анализировали на содержание редуцирующих веществ методом эбулиостатического титрования.

Определение трудногидролизуемых полисахаридов

Остаток после гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов подсушивали при температуре 50-60ºС до воздушно-сухого состояния, количественно переносили в колбу и заливали 40 мл 80 %-ной серной кислотой.

Гидролиз продолжали в течение 3 часов, тщательно перемешивая реагирующую смесь через каждые 10-15 минут. За это время трудно гидролизуемые полисахариды превращались в декстрины. Для проведения инверсии декстринов реагирующую смесь количественно переносили в коническую колбу вместимостью 1000 мл, расходуя при этом около 600 мл дистиллированной воды. После чего колбу с реагирующей смесью ставили на кипящую водяную баню, закрывали пробкой с обратным холодильником и нагревали в течение 5 часов. Затем раствор образовавшихся моносахаридов фильтровали на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывали небольшими порциями горячей воды до отрицательной реакции промывной воды на кислоту.

Фильтрат и промывные воды количественно переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Объем раствора доводили до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Затем в мерную колбу вместимостью 100 мл вливали 50 мл полученного гидролизата и нейтрализовали серную кислоту 20 %-ным раствором едкого натра, прибавляя его по каплям при постоянном перемешивании. После охлаждения нейтрализованного раствора до комнатной температуры его объем доводили до метки дистиллированной водой. Раствор хорошо перемешивали и анализировали на содержание редуцирующих веществ методом эбулиостатического титрования.

Количество моносахаридов полученных при гидролизе легко- и трудногидролизуемых полисахаридов (X), % (от абсолютно сухого сырья) вычисляли по формуле (4):

$$x = \frac{C \times V \times n \times k}{m \times 100} \times 100 \text{ (4)},$$

где С – концентрация моносахаридов в полученном гидролизате легкогидролизуемых (или трудногидролизуемых) полисахаридов, %; V – объем полученного гидролизата легкогидролизуемых (или трудногидролизуемых) полисахаридов, мл; n – разбавление гидролизата при его нейтрализации; k – коэффициент пересчета моносахаридов в полисахариды; m – навеска абсолютно сухой навески образца, взят для гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов, г.

Эбулиостатический метод определения редуцирующих сахаров

Определение редуцирующих сахаров проводили по методу Низовкина и Емельяновой. Для установления титра меднощелочного раствора на аналитических весах с точностью до 0,002 г взвешивали около 0,1 г абсолютно сухой глюкозы и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводили до метки дистиллированной водой и перемешивали. Концентрацию приготовленного раствора вычисляли по стандартной схеме. После чего, наливали его в бюретку и проводили титрование 10 мл меднощелочного раствора (по 5 мл растворов Фелинг I и Фелинг II) в эбулиостате. На основании полученных данных при титровании глюкозного раствора титр меднощелочного раствора (Т), мг вычисляли по формуле (5):

$$T = C \times V \quad (5),$$

где С – концентрация раствора глюкозы, мг/мл; V – объем раствора глюкозы, пошедший на титрование, мл.

Полученные гидролизаты заливали в бюретку. После закипания воды в колбе, вынимали эбулиостат и из дозаторов в него приливали по 5 мл растворов Фелинг I и Фелинг II. Легкими движениями перемешивали жидкость в эбулиостате и медленно вставляли его в колбу. Затем в эбулиостат вставляли кончик бюретки с анализируемым раствором. После того, когда меднощелочной раствор в эбулиостате закипал, в него из бюретки по каплям вливали анализируемый раствор до появления ярко-желтой окраски реагирующей жидкости. Затем по шкале бюретки фиксировали объем анализируемого раствора, пошедшего на титрование.

Концентрацию редуцирующих веществ (Х), % в исследуемой пробе в пересчете на глюкозу находили по формуле (6):

$$X = \frac{T \times n}{V \times 1000} \quad (6),$$

где Т – титр меднощелочного раствора по глюкозе, мг; V – объем анализируемого раствора сахара, пошедшего на титрование, мл; n – разведение; 1000 – перевод миллиграммов в граммы.

Определение содержания глюканов в мицелии

Определение содержания глюканов, α- и β-глюканов проводили в соответствии с процедурами, разработанными для наборов образцов «Грибы и дрожжи. Бета-глюкан» K-YBGL 09/13 (www.megazyme.com) .

Для определения общего содержания глюканов точную навеску в 100 мг, измельченного образца мицелия, взвешенную с точностью 0,002 г, помещали в пробирки и добавляли 1,5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты (37 %). После чего закрывали пробирки крышкой, энергично перемешивали и помещали на водяную баню при температуре 30±1°С на 45 минут, периодически энергично встряхивали каждые 15 минут для полного растворения мицелия. Добавляли 10 мл воды в каждую пробирку и помещали на кипящую водяную баню при температуре 100±1°С на 2 часа. Охлаждали пробирки до комнатной температуры и добавляли 10 мл 2 N гидроксида калия. Количественно переносили содержимое каждой пробирки в мерные колбы объемом 100 мл с помощью 200 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 5,0), тщательно перемешивали и цетрифугировали при 1500 об./мин. в течение 10 минут.

Переносили 0,1 мл аликвоты супернатанта в пробирку и добавляли 0,1 мл смеси экзо-1,3-β-глюканазы (активностью 20 ед./мл) и β-глюкозидазы (активностью 4 ед./мл) в 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,0). После чего пробирки инкубировали на водяной бане при температуре 40±1°С в течение 60 минут. Добавляли 3,0 мл реактива «GOPOD» (смесь глюкозооксидазы и пероксидазы) и инкубировали на водяной бане при температуре 40±1°С в течение 20 минут. После чего измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре «Юнико-2804» (Россия) при длине волны 510 нм.

Общее количество глюканов (X), % определяли по формуле (7):

$$X=\Delta E\times F\times \frac{100}{0.1}\times \frac{1}{1000}\times \frac{100}{W}\times \frac{162}{180} \quad (7),$$

где ΔE – разница оптической плотности опытного и контрольного образцов; F – коэффициент перевода оптической плотности раствора D-глюкозы в мкг; 100/0.1 – поправочный коэффициент на объем; 1/1000 – коэффициент перевода мкг в мг; 100 –

коэффициент перевода массы образца в 100 мг; W – масса анализируемого образца, мг; 162/180 – коэффициент преобразования свободной D-глюкозы.

Для определения α-глюкана точную навеску в 100 мг, измельченного образца мицелия, взвешенную с точностью 0,002 г, помещали в пробирки и добавляли 2 мл 2 М гидроксида калия в каждую пробирку. Перемешивали в течение 20 минут на ледяной бане с помощью магнитной мешалки. После чего добавляли 8 мл 1,2 М натрий-ацетатного буфера (pH 3,8) и 0,2 мл смеси амилоглюкозидазы (активностью 1630 ед. /мл) и инвертазы (активностью 500 ед./мл) в каждую пробирку, перемешивали и помещали на водяную баню при температуре 40±1°С в течение 30 минут. Количественно переносили содержимое каждой пробирки в мерные колбы объемом 100 мл с помощью дистиллированной воды, тщательно перемешивали и цетрифугировали при 1500 об./мин. в течение 10 минут.

Переносили 0,1 мл аликвоты супернатанта в пробирку и добавляли 0,1 мл 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) и 3,0 мл реактива «GOPOD» (смесь глюкозооксидазы и пероксидазы). После чего инкубировали на водяной бане при температуре 40±1°С в течение 20 минут. Измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре «Юнико-2804» (Россия) при длине волны 510 нм.

Количество α-глюканов (X_α), % определяли по формуле (8):

$$X_\alpha = \Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \quad (8),$$

где ΔЕ – разница оптической плотности опытного и контрольного образцов; F – коэффициент перевода оптической плотности раствора D-глюкозы в мкг; 1000 – поправочный коэффициент объема для α-глюканов; 1/1000 – коэффициент перевода мкг в мг; 100 – коэффициент перевода массы образца в 100 мг; W – масса анализируемого образца, мг; 162/180 – коэффициент преобразования свободной D-глюкозы.

Количество β-глюканов (X_β), % определяли по формуле (9):

$$X_\beta = X - X_\alpha \quad (9),$$

где X – общее количество глюканов, %; X_α – количество α-глюканов, %.

Определение содержания золы в мицелии

Перед анализом определяли влажность образцов на анализаторе влажности MX-50/MF-50 (AND, Япония). Далее исследуемую пробу помещали в фарфоровый тигель и осторожно обугливали на электроплитке до прекращения выделения дыма, не допуская воспламенения и выбросов. После чего тигель помещали в холодную муфельную печь, и, повышая ее температуру на 50±1ºС каждые полчаса, доводили температуру печи до 450±1ºС. При этой температуре минерализацию продолжали в течении 10-12 часов до получения светло-серой золы без обугленных частиц.

Количество золы (X), % вычисляли в процентах по отношению к массе абсолютно-сухого образца по формуле (10):

$$X = \frac{G_1 \times 100}{G} \text{ (10)},$$

где G_1 – масса золы, г; G – навеска абсолютно сухой пробы, взятая на анализ, г.

Определение доли в лаги в полученной биомассе

Для определения содержания массовой доли влаги использовали анализатор влажности MX-50/ MF -50 (Япония). Температура сушки составляла 120±1ºС. Нагреву подвергали пробу образца массой 1,0 г, взвешенную с точностью до 0,002 г, находящуюся на электронных весах, которые взвешивали пробу до и после нагрева, чтобы определить потерю влаги.

2.2.9 Определение степени переваримости белка

В специальном приборе – аппарат искусственный желудок, состоящем из шести отдельных ячеек, каждая из которых состоит из двух стаканов (рисунок 5), разделённых полупроницаемой мембраной, проводили определение степени переваримости белка ферментами пищеварительного тракта: пепсином и трипсином. Внешний стакан имеет рубашку, которая заполняется водой, поступающей из термостата. Донышко внутреннего стакана представляет собой полупроницаемую мембрану. Внутренний стакан снабжён мешалкой.

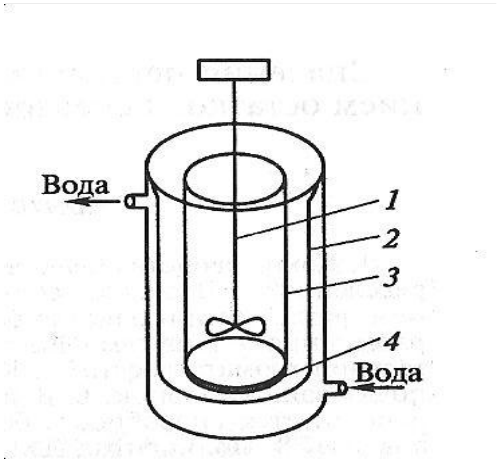


Рисунок 5 – Схема прибора для определения степени переваримости под действием пищеварительных ферментов *in vitro*:

1-мешалка; 2-внешний стакан; 3-внутренний стакан; 4-полупроницаемая мембрана

Навеску 0,5 г измельчённого образца тщательно растирали в ступе с небольшим количеством глицинового буферного раствора (pH 2,2), взятого из общего исходного объёма 15 мл, и количественно переносили во внутренний стакан, используя для смыва оставшийся буфер.

В наружный стакан помещали глициновый буфер (pH 2,2) столько, чтобы уровень жидкости в обоих стаканах был одинаковым, прибор подключали к термостату (37±1°C) и после выравнивания температур во внутренний стакан перенести 15 мг пепсина. Концентрация пепсина при этом составляла 1 мг/мл, что соответствует средней его концентрации в желудочном соке. Реакцию проводили при перемешивании жидкости мешалкой со скоростью 60 об/мин. Через 3 часа из наружного сосуда отбирали 1 мл жидкости.

При проведении дальнейшей реакции гидролиза жидкость из наружного сосуда заменяли равным объемом 0,05 М щелочного глицинового буферного раствора, имеющего pH 8,4. Пробы во внутренних сосудах нейтрализовали добавлением 2,0 н раствора гидроксида натрия. Затем добавляли 0,2 н раствор гидроксида натрия, доводя до щелочной реакции среды, близкой к оптимальной для действия трипсина. После этого во внутренний сосуд добавляли 15 мл глицинового буферного раствора (pH 8,4). Пробы термостатировали и,

выравнив температуры, вносили 15 мг кристаллического трипсина. Концентрация трипсина при этом составляла 0,5 мг/мл, что соответствует средней его концентрации в кишечном содержимом человека. Пробы отбирали также, как и при работе с трипсином [80].

Продукты гидролиза определяли методом Лоури и выражали в условных единицах мкг тирозина, используя калибровочный график (рисунок 6). Величину оптической плотности измеряли на ФЭК-56.

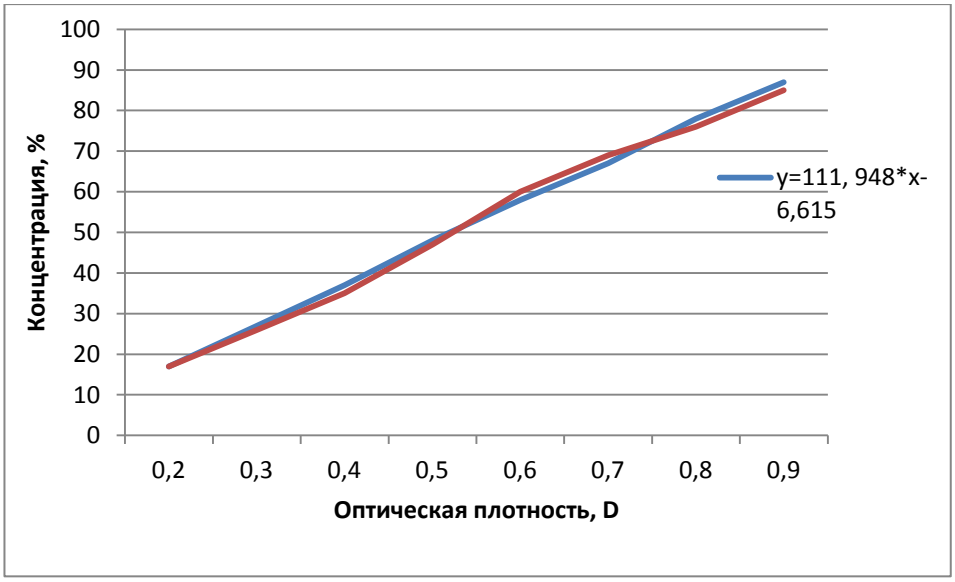


Рисунок 6 – Калибровочный график зависимости концентрации тирозина от оптической плотности

2.2.10 Исследование токсичности штаммов на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*

Оценка токсичности биологически активных метаболитов и экстрактов мицелия у штаммов, рекомендованных как продуцентов в различных отраслях в биотехнологии, является обязательным этапом на пути их внедрения. Такие исследования проводятся с использованием организмов разных систематических групп, что дает более объективную картину. Первый этап оценки токсичности проводили на одноклеточных простейших [119, 120].

Подготовка проб водных и спиртовых экстрактов мицелия

Для исследования на инфузориях экстракты получали по методикам, описанным выше. Для спиртовых экстрактов делали дополнительную подготовку: доводили экстракт о концентрации спирта 1%.

Первый этап биотестирования на инфузориях Paramecium caudatum

Проведение первого этапа биотестирования на инфузориях *Paramecium caudatum* осуществляли в соответствии с техническим описанием с использованием прибора БиоЛаТ-3, компьютера с программой AutoCiliataXP, разработанной автором Е.Г. Черемных в Московском государственном университете прикладной биотехнологии [81, 119]. Проведение первого этапа начинали с внесения в лунки дозаторной пипеткой по 0,1 мл среды с инфузориями *Paramecium caudatum* и 0,5 мл проб внутреннего круга планшета.

Затем задавали параметры исследования, состоящие в назначении лунок пробам и названий проб, времени экспозиции и других условий опыта. После кодирования параметров проб и назначения лунок, запускали процесс, который состоит в многократном подсчете подвижных инфузорий в пробах в течение экспозиции, равной 2 часам.

В экстракты вносили популяцию *P. caudatum* титром 5×10^3 клеток/мл и культивировали в течение 2 часов. Включали прибор на режим «Экспрессное исследование». Индикацию количества живых клеток в этот период производили в виде графика, в котором по оси абсцисс отложен номер подсчета, а по оси ординат подсчитанное число клеток.

Расчет коэффициента ($К_1$) производили по формуле (11):

$$К_1=\frac{N_1}{N_2} \quad (11),$$

где N_1 – количество живых инфузорий после экспозиции в пробе; N_2 - количество живых инфузорий до начала этапа опыта.

Оценку токсичности по первому этапу биотестирования производили автоматически на основании критериев, указанных в таблице 1.

Таблица 1 - Критерии оценки токсичности на *Paramecium caudatum*

Коэффициент выживаемости *Paramecium caudatum*, $К_1$	Оценка токсичности
Экстракт	
>=0,9	Нетоксичная проба
<= 0,50	Токсичная проба
Все остальные варианты значений коэффициента выживаемости учитываются при вычислении комплексной оценки после второго и третьего этапов	

Таким образом, в результате первого этапа исследования токсичности объектов получали 2 возможные оценки: токсичный и нетоксичный объект, и уточняли оценку на втором этапе.

Второй этап биотестирования на инфузориях Tetrachymena pyriformis

Второй этап начинали с того, что в заданные лунки внешнего круга планшета прибора вносили 10 мкл культуры инфузорий *T. pyriformis* и подготовленные исследуемые пробы (водные и спиртовые экстракты мицелия). В качестве контроля использовали исходную питательную среду без добавления фильтратов и экстрактов. Подсчет клеток в 10 мкл вносимой культуры осуществляли в режиме «Длительное исследование – Начало». Через 24 часа включали прибор БиоЛаТ-3 и проводили подсчет клеток в режиме «Длительное исследование – Продолжение» [120]. Заключение производили на основе критериев ($К_2$), указанных в таблице 2, вычисленных по формулам (12) и (13):

$$K_2 = \frac{N_2}{N_{1*} K_{конр}} \quad (12);$$

$$K_{контр} = \frac{N_{1контр}}{N_{2конр}} \quad (13),$$

где N_1, $N_{1контр}$ – количество инфузорий до начала экспозиции в пробе и контроле; N_2, $N_{2контр}$ - количество живых инфузорий по окончании второго или третьего этапа опыта.

Таблица 2 - Критерии оценки степени токсичности на инфузории *Tetrachymena pyriformis*

Коэффициент прироста инфузорий *Tetrahymena pyriformis* за 24 часа экспозиции, K_2	Оценка степени токсичности или решение о продолжении исследования
>=0,9	Объект нетоксичен
<=0,5	Объект токсичен
Примечание: Все остальные варианты значений коэффициента прироста учитываются при вычислении комплексной оценки после третьего этапа	

2.2.11 Оценка влияния физических факторов на ростовые показатели базидиомицетов

Основной причиной, усложняющими работу по наращиванию мицелиальной биомассы, является медленный рост продуцентов. Для увеличения скорости роста медленнорастущих продуцентов используют различные факторы: физические, химические и биологические.

Одним из существенных факторов ускорения роста биологических объектов является облучение лазером. Известно, что использование лазера позволяет ускорить рост мицелия и образование базидиом у макромицетов *Lentinus edodes, Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus* [95, 226].

Другой фактор, который можно использовать для исследований, это использование звуковых волн низкой частоты, которые оказывают значительное влияние на ускорение прорастания семян злаковых культур и рост прокариот [51, 52].

Изучение влияния облучения когерентным и некогерентным светом в видимой части спектра на показатели роста штаммов

Оптическое облучение проводили на опытных установках, разработанных в лаборатории лазерных методов диагностики и лечения опухолей Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина.

На первом этапе исследования облучение штаммов проводили лазером мощностью 33 мВт и длине волны 1,264 нм при экспозиции 12 и 60 секунд. Облучение проводили однократно и многократно через: 1, 2 и 3 суток культивирования.

На втором этапе исследования облучение штаммов проводили светодиодами, используя несколько видов мощностей (таблица 3) с экспозицией 30 секунд.

Таблица 3 – Варианты мощностей, используемых при облучении исследуемых штаммов светодиодами

№ п/п	Мощность, мВт	Длина волны, нм
1	0,4	578
2	2,0	400
3	2,0	518
4	2,6	496
5	4,0	467
6	7,5	461

Учет действия лазерного излучения на рост мицелия штаммов оценивали по ростовым показателям, описанным выше.

Изучение влияния акустических волн в слышимом диапазоне частот на скорость роста штаммов

Для оценки влияния акустических волн в слышимом диапазоне частот мощностью 200, 1000 и 2000 Гц проводили облучение исходного инокулюма, после посева в чашку Петри, звуковым генератором, разработанным в МГУПП с экспозицией 60 секунд. Учет влияния акустических волн на штаммы оценивали по ростовым показателям, описанным выше.

2.2.12 Изучение свойств препарата мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor*

Определение массовой доли белка

Определение массовой доли белка в колбасном продукте проводили по методу Къельдаля по ГОСТ 25011-81.

Определение массовой доли жира

Определение массовой доли жира в колбасном продукте проводили гравиметрическим методом на аппарате Сокслета по ГОСТ 23042-86.

Определение массовой доли золы

Определение массовой доли золы проводили сухим озолением по ГОСТ Р 53642-2009.

Определение pH

Величину pH определяли потенциометрическим методом на pH-метре HANNA HI 98103. Величину pH определяли в водной вытяжке из измельченной пробы с добавлением дистиллированной воды, приготовленной в соотношении 1:10. Смесь настаивали 30 минут при периодическом перемешивании и фильтровали через бумажный или ватный фильтр. После проверки прибора по буферному раствору в сосуд для электродов помещали испытуемый раствор, погружали электроды и по верхней шкале отсчитывали показания прибора [59].

Определение степени набухаемости препарата мицелия

Взешивали на торзионных весах три навески исследуемого образца (от 20 до 30 мг) и помещали их в бюксы с 20 мл воды. Через 40 минут исследуемые образцы одновременно извлекали из бюксов, осторожно подсушивали фильтровальной бумагой и снова взвешивали на торзионных весах [59].

Вычислили процент набухания (Q),% по формуле (14):

$$Q=\frac{(q-q_0)}{q_0}\times 100 \quad (14),$$

где q_o – вес образца до набухания, мг; q – вес набухшего образца, мг.

Определение водосвязывающей способности

Водосвязывающую способность определяли по методу Грау. Навеску мицелия гриба, прошедшего термообработку, массой 0,3 г взвешивали на торзионных весах на кружке из полиэтилена диаметром 15-20 мм, после чего ее переносили на беззольный фильтр, помещенный на стеклянную пластинку так, чтобы навеска оказалась под кружком. Сверху навеску накрывали такой же пластинкой, что и нижнюю, устанавливали на нее груз массой 1 кг и выдерживали в течение 10 минут. После этого фильтр с навеской освобождали от груза и нижней пластинки, а затем карандашом очерчивали контур пятна вокруг спрессованного мицелия. Внешний контур вырисовывали при высыхании фильтровальной бумаги на воздухе. Площади пятен, образованных спрессованным мицелием и адсорбированной влагой, измеряли планиметром. Размер влажного пятна (внешнего) вычисляли по разности между общей площадью пятна и площадью пятна, образованного мицелием. Экспериментально установлено, что 1 $см^2$ площади влажного пятна фильтра соответствует 8,4 мг влаги. [59].

Массовую долю связанной влаги (ВСС),%, не отделившейся при прессовании, определяли по формуле (15):

$$\text{ВСС} = \left(\frac{M - 8{,}4 \times S}{m}\right) \times 100 \quad (15),$$

где M – общая доля влаги в навеске, мг; S – площадь влажного пятна, мг; m – масса навески образца, мг.

Определение водоудерживающей способности

Для определения влагоудерживающей способности навеску тщательно измельченного образца равномерно наносили стеклянной палочкой на внутреннюю поверхность жиромера в его широкой части, затем плотно закрытый жиромер помещали на водяную (узкой частью вниз) и выдерживали при температуре кипения воды 15 минут, после чего определяли количество выделившейся влаги по шкале жиромера [59].

Водоудердивающую способность (ВУС), % рассчитывали по формуле (16):

$$ВУС= В - ВВС \quad (16),$$

где ВВС – влаговыделяющая способность образца, %; В – общая массовая доля влаги в навеске, %.

Влаговыделяющую способность (ВВС), % вычисляли по формуле (17):

$$ВВС=(a\times n\times m^{-1})\times 100 \quad (17),$$

где а – цена деления жиромера, $см^3$; n – число делений на шкале жиромера; m – масса навески, г.

Определение жироудерживающей способности

В пластиковые центрифужные пробирки емкостью 30 мл помещали 2,0 г, с точность до 0,001 г исследуемого препарата и добавляли от 1 до 11 мл растительного масла с интервалом 0,5 мл. Содержимое пробирок перемешивали стеклянными палочками в течение 10 минут. Далее пробирки с суспензиями препарата центрифугировали 15 минут при 2000 об./мин. За величину ЖУС принимали максимальное количество добавленного масла, при котором не наблюдается отделение масляной фазы в процессе испытания, в пересчете на 1 г препарата [114].

Жироудерживающую способность (ЖУС), г масла/г препарата рассчитывали по формуле (18):

$$ЖУС=V_l - \frac{V_l \times P_l}{100} \quad (18),$$

где V_l – объем масла, вносимого в исследуемую пробу, согласно методике, г (жиромодуль); P_l – количество отделившегося масла после проведения испытаний, %.

Определение гелеобразующей способности

При приготовлении исходной суспензии соотношение сухого образца: вода составляло 1:3. Суспензию тщательно перемешивали до получения однородной консистенции, используя фарфоровую ступку с пестиком, так как наличие комков недопустимо. Полученную суспензию выдерживали 1 час при комнатной температуре.

Используя исходную суспензию, готовили серию суспензий образца в дистиллированной воде и переносили в стеклянные пробирки. Пробирки закрывали резиновыми пробками, помещали в термостат типа ТС – 1 СПУ и выдерживали 15 минут при температуре 74-76 ^{0}С. После прогрева пробирки охлаждали холодной водой до комнатной температуры, помещали в холодильник, где их выдерживали 16-18 часов при температуре 4-6 ^{0}С. Затем на поверхность суспензии помещали свинцовые шарики, имеющие среднюю массу 0,53 г и, выдерживали 2 часа при температуре 2-6 ^{0}С.

За критическую концентрацию гелеобразования при 4 ^{0}С принимали концентрацию образца, соответствующую пробе, в которой не происходило разрушение геля под давлением свинцового шарика [114].

Определение эмульсионных свойств

Исследуемый препарат диспергировали в воде, к полученной суспензии добавляли растительное масло и эмульгировали на гомогенизаторе 2 минуты при максимальной скорости вращения (8000-10000 об/мин). Полученные эмульсии переносили в пластиковые центрифужные пробирки объемом 10 мл, помещали на водяную баню температурой 74-76 ^{0}С и выдерживали 15 минут. После чего эмульсии охлаждали холодной водой до комнатной температуры и выдерживали 2 часа. Полученные эмульсии центрифугировали 15 минут при 2500 об./мин. Устойчивыми эмульсиями с различными соотношениями компонентов считали те, в которых не происходило отделение водной или жировой фаз [114].

Определение перекисного числа

Определение перекисного числа проводили методом титрования в соответствии с ГОСТ Р 51487-99.

Определение кислотного числа

Определение кислотного числа проводили методом титрования в соответствии с ГОСТ Р 50457-92.

Определение хлорида натрия

Определение хлорида натрия проводили по методу Мора в соответствии с ГОСТ 9957-73.

Определение предельного напряжения сдвига

Определение предельного напряжения сдвига проводили на полуавтоматическом пенетрометре в соответствии с ГОСТ Р 50814-95.

Определение пластичности

Метод основан на определении степени раздавливания навески материала при воздействии фиксированной нагрузки [101].

Расчет пластичности (П), $см^2/г$ осуществляли по формуле (19), используя данные, полученные при определении водосвязывающей способности:

$$П=S_н/М \quad (19),$$

где П- пластичность, $см^2/г$; $S_н$ – площадь от раздавленной навески, $см^2$; М – масса навески, г.

Определение потерь при термообработке

Модельные образцы продукта взвешивали в сыром и в термообработанном виде, после остывания [101].

Величину потерь (Х), % рассчитывали по формуле (20):

$$X= \frac{M_к - M_с}{M_к} \times 100 \quad (20),$$

где $М_к$ – масса продукта после тепловой обработки, г; $М_с$ – масса продукта до тепловой обработки, г.

Оценка органолептических показателей

Оценку органолептических показателей проводили методом сравнения в соответствии с ГОСТ 9959-91.

Определение микробиологических показателей безопасности

Подготовку проб для определения микробиологических показателей безопасности проводили в соответствии с ГОСТ Р 51448-99.

Исследование микробиологических показателей безопасности проводили по следующим параметрам с использованием соответствующих методов анализа: определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили в соответствии с ГОСТ 10444.15-94; выявление и определение количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) проводили в соответствии с ГОСТ Р 52816-2007; выявление и определение количества сульфитредуцирующих клостридий проводили в соответствии с ГОСТ 29185-91; выявление и определение количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* проводили в соответствии с ГОСТ Р 52815-2007; выявление бактерий рода *Salmonella* проводили в соответствии с ГОСТ Р 52814-2007; выявление и определение бактерий *Listeria monocytogenes* проводили в соответствии с ГОСТ Р 51921-2002; определение дрожжей и плесневых грибов проводили в соответствии с ГОСТ 10444.12-88.

Получение покрытий для пищевых продуктов с препаратом сухого мицелия и культуральным фильтратом штамма В 08/06 Trametes versicolor

Для получения препарата сухого мицелия и культурального фильтрата штамм *T. versicolor* В 08/06 культивировали на жидкой питательной среде Maltax 10, имеющей следующий состав: Maltax 10 – 50 г, вода – 1000 мл при температуре 27±1°С в течении 14 суток. Биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости фильтрованием и сушили в сушильном шкафу ТС-80-01 при температуре 40±1°С до постойной массы. Высушенный мицелий измельчали в порошок на гомогенизаторе и добавляли в водный раствор метилцеллюлозы, после чего проводили дробную стерилизацию при температуре 100±1^{o}С трехкратно.

В другом варианте культуральную жидкость, полученную в результате жидкофазного статического культивирования, отфильтровывали через мембранный фильтр фирмы «Владипор» и использовали в качестве растворителя для получения раствора метилцеллюлозы, как описано выше.

После чего полученный раствор дробно стерилизовали при температуре 100±1°С.

Получение покрытий для пищевых продуктов с жизнеспособным мицелием штамма В 08/06 Trametes versicolor путем биоконверсии

При получении полимерного раствора с жизнеспособным мицелием штамма В 08/06 *T. versicolor* брали стерильный водный раствор метилцеллюлозы, охлажденный до комнатной температуры и вносили в него посевной материал мицелия *Trametes versicolor*. После чего проводили культивирование в термостате ТС-80 М-2 при температуре 27±1°С или на шейкере в течение 14 суток, до максимального накопления биомассы.

Определение биостойкости в отношении плесневых грибов

Определение биостойкости полученных пленок проводили в отношении микромицетов рода *Penicillium*, вызывающих плесневение пищевых продуктов, в соответствии с ГОСТ 9.049-91.

Определение антимикробной активности пленки

Антимикробную активность проводили для пленок, полученных из метилцеллюлозы с добавлением различных компонентов штамма В 08/06 *T. versicolor*, контролем служила пленка, полученная из 2%-ного водного раствора метилцеллюлозы. Исследования проводили на тест-культурах условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов, как описано выше. Учет проводили результатов путем визуальной оценки колонизации пленок [56].

Определение вязкости растворов полимеров

Определение вязкости водных растворов полимеров проводили по методу Гепплера в соответствии с ГОСТ 18249-72.

Определение разрушающего напряжения и относительного удлинения плёнок

Определение разрушающего напряжения и относительного удлинения пленок проводили на разрывной машине «РМ-50» в соответствии с ГОСТ 14236-81.

Метод испытания устойчивости покрытия метилцеллюлозы на пищевых продуктах

Испытания покрытия проводили на ряде пищевых продуктов, выбор которых был обусловлен спецификой их хранения и возможностью поражения микроорганизмами, вызывающими порчу пищевых продуктов: чернослив, курага, сырокопченая колбаса.

Покрытие проводили путем индивидуального погружения продуктов в раствор полимера, полученного путем биоконверсии метилцеллюлозы штаммом В 08/06 *T. versicolor* с последующей сушкой продукта при комнатной температуре до постоянной массы. В качестве контроля использовали продукты без покрытия. Условия хранения подбирали в соответствии с требованиями, предъявляемыми производителями к условиям хранения.

Оценку результатов проводили по показателям: убыли массы продукта; инфицируемости поверхности продуктов плесневыми грибами и микробиологическим показателям.

Убыть массы проводили измерением потери влаги (Р), %, которую рассчитывали по формуле (21):

$$P = \frac{(m - m_i)}{m} * 100 \quad (21),$$

где m – масса продукта на начало хранения, г; m_i – масса продукта в течении *i*-ого дня, г

Исследование микробиологических показателей безопасности проводили по следующим параметрам с использованием соответствующих методов анализа, описанным выше.

2.2.13 Статистическая обработка полученных результатов

При проведении научно-исследовательской работы были получены пять параллельных результатов эксперимента. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием пакета программ *Statistica* 6.0.

Для расчета были использованы следующие обозначения: среднее значение (X) определяли по формуле (22):

$$X = \frac{\sum Xi}{n} \quad (22),$$

где X_i – значение итого измерения; n – число повторностей;

среднее квадратичное отклонение (σ) определяли по формуле (23):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X - Xi)^2}{n-1}} \quad (23),$$

где X – среднее значение; Xi – значение итого измерения; n – число повторностей;

дисперсию (D) определяли по формуле (24):

$$D = \sigma^2 \quad (24),$$

где σ – среднее квадратичное отклонение;

среднюю ошибку опыта (m) определяли по формуле (25):

$$m = \sqrt{\frac{D}{n}} \quad (25),$$

где D – дисперсия; n – число повторностей.

Стандартное отклонение или средняя квадратичная ошибка (S_x) определяли по формуле (26):

$$S_x = \frac{\sqrt{\sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2}}{n-1} \quad (26),$$

где n-1 – число степеней свободы; n – число определений; x_i – величина, полученная в результате опыта; $\bar{x}$ – среднее арифметическое из параллельных опытов.

Доверительный интервал определяли по формуле (27):

$$\bar{x} - t\frac{S_x}{\sqrt{n}} \le \mu \le \bar{x} + t\frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad (27),$$

где $\bar{x}$ - среднее арифметическое из параллельных опытов; t – критерий Стьюдента при доверительной вероятности, равной 95 %. При числе опытов n=5, t=2,78; S_x – стандартное отклонение или средняя квадратичная ошибка; μ – доверительный интервал; n – число определений.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*

Наличие противобактериальной, противоопухолевой и противовирусной активности базидиомицетов родов *Fomitopsis* и *Trametes* было показано исследованиями ряда отечественных и зарубежных авторов. Проявление противоопухолевой и антимикробной активности у грибов рода *Trametes* связывают с наличием в мицелии полисахаридов и ферментов, а у представителей рода *Fomitopsis* с присутствием специфических органических кислот, ароматических лактонов и тритерпенов [79, 123-125, 183].

3.1 Антибактериальная активность в отношении контаминантов пщевых продуктов

Сохранение качества пищевых продуктов, а также снижение микробной обсемененности поверхности продукции является актуальной задачей. Поэтому выбор данных тестовых культур связан с тем, что они являются санитарно-показательными организмами для большинства пищевых продуктов при контроле микробиологических показателей.

Исследования культуральных фильтратов, водных и спиртового экстрактов 18 штаммов базидиомицетов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении тест-организмов: грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis* АТСС 6633, *Bacillus coagulans* 429, *Staphylococcus aureus* 6538-Р *и Listeria monocytogenes* 766), грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* М 17 и дрожжеподобного гриба *Candida albicans* показали, что наиболее активным штаммом из рода *Trametes* является *Trametes spp.* В 08/06. Показано, что наиболее активными были штаммы рода *Fomitopsis*: Fp-04/99, Fp-02/06, Fp-04/06, Tyv-6/bal-11, Tyv-6/shag-3 и Tyv-2006 (ПРИЛОЖЕНИЕ 1). Так как показатели зоны задержки роста тест-культур фильтратами и экстрактами, полученными из мицелия данного рода, достоверно не различались, то для дальнейших исследований использовали штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006,

Fomitopsis spp. Fp-04/99, а также *Trametes spp.* B 08/06, отобранный из объектов рода *Trametes*.

Исследования показали, что все используемые тест-культуры чувствительны к метаболитам исследуемых штаммов штамма, однако, степень чувствительности - неодинакова. Результаты антибактериальной активности приведены на рисунке 7.

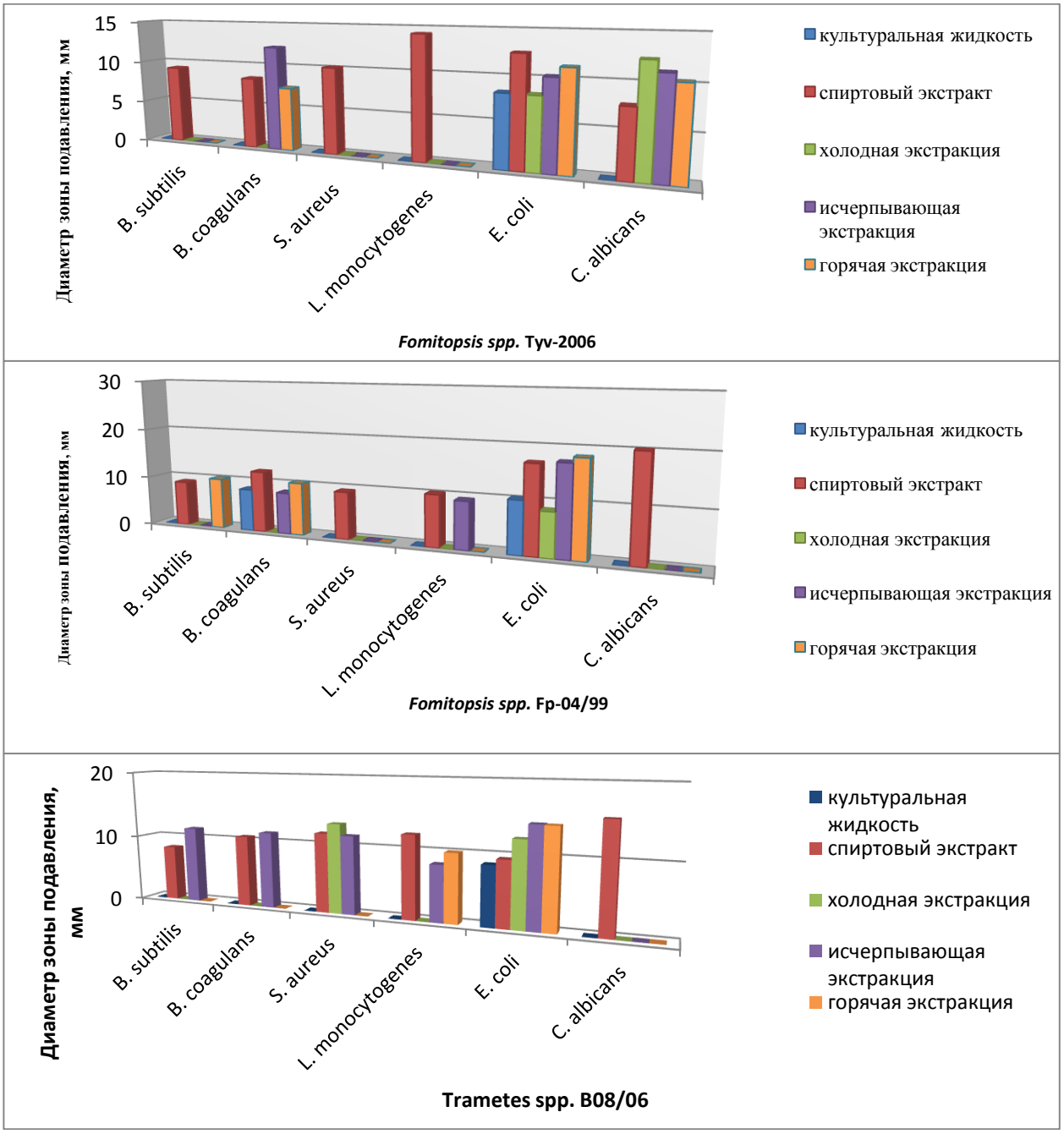


Рисунок 7 – Диаметры зоны подавления роста тест-организмов культуральными, спиртовыми и водными экстрактами штаммов *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06

Исследования показали, что все исследуемые штаммы в биомассе мицелия синтезируют антимикробные соединения. Спиртовые экстракты мицелия штаммов *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 обладают антибактериальной активностью в отношении всех тест-культур микроорганизмов.

Установлено, что активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий выше у экстрактов мицелия исследуемых штаммов, полученных методом исчерпывающей экстракции мицелия (в течение 24 часов при температуре 60^{o}C). Экстракт мицелия штамма *Trametes spp.* B 08/06, полученный методом исчерпывающей экстракции, вызывает зоны подавления роста у грамположительных и грамотрицательных бактерий несколько больше, чем спиртовый экстракт. Однако, следует отметить, что фунгицидное и фунгистатическое действие в отношении *Candida albicans* у данного экстракта не обнаружено.

Водные экстракты штаммов *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06, полученные методами холодной и горячей экстракции мицелия, обладают избирательным действием в отношении тест-штаммов бактерий и штамма *Candida albicans*. Экстракты мицелия всех штаммов, полученные методом холодной экстракции, проявляют антимикробные свойства в отношении *Escherichia coli*, вызывая зоны подавления роста от 8,2 до 12,3 мм в диаметре. Экстракт штамма *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, полученный методом холодной экстракции, проявляет антимикробную активность в отношении *B. coagulans* и *C. albicans*, а экстракт *Trametes spp.* B 08/06 задерживает рост тест-штамма *S. aureus*.

Водные экстракты мицелия, полученные методом горячей фильтрации, и культуральные фильтраты всех исследуемых продуцентов проявляют активность в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* M 17, а также избирательную активность в отношении грамположительных бактерий. Водный экстракт мицелия *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, полученный методом

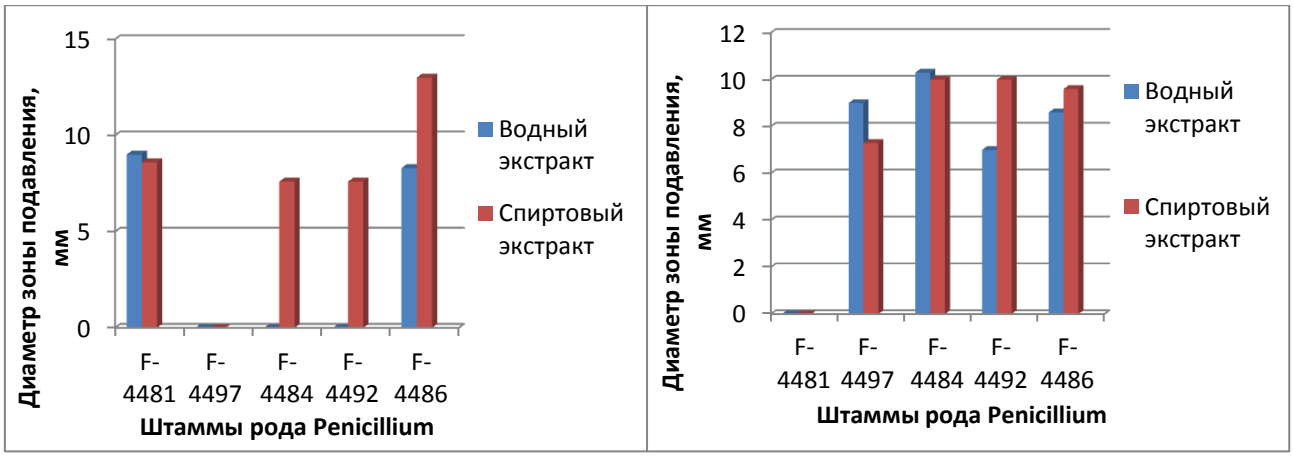
горячей экстракции, проявляет зону задержки роста у дрожжеподобного гриба *Candida albicans* диаметром 10,2 мм.

3.2 Антибиотическа и миколитическая активность в отношении микромицетов рода *Penicillium*

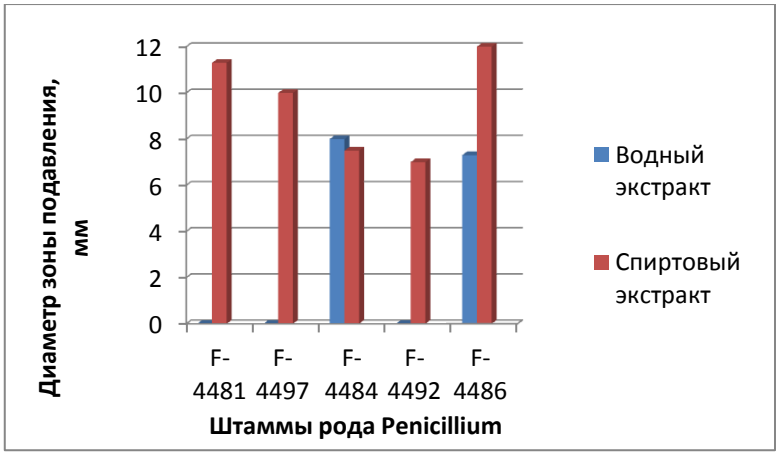
Исследованиями ряда авторов показано, что основными представителями плесневых грибов, поражающих пищевую продукцию такую как твердые сорта колбас и сыров, являются представители рода *Penicillium* [67, 73].

Противоплесневая активность культуральных фильтратов, водного (метод исчерпывающей экстракции) и спиртового экстрактов 18 штаммов базидиомицетов родов *Fomitopsis* и *Trametes* исследовали методом дисков в отношении тест-культур микроскопических грибов рода *Penicillium,* выделенных с поверхности пищевых продуктов и из воздуха холодильных камер для хранения готовой продукции. Исследования показали, что наиболее активными штаммами из рода *Trametes* являются штаммы: 01/06, 02/06 и В 08/06. Установлено, что наибольшую противоплесневую активность проявляли штаммы рода *Fomitopsis:* Fp-04/99, Tyv-6/bal-11, Tyv-6/shag-3 и Tyv-2006 (ПРИЛОЖЕНИЕ 2). Так как показатели зоны задержки роста тест-культур фильтратами и экстрактами, полученными из мицелия данных родов, достоверно не различались, то для дальнейших исследований использовали штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006**,** *Fomitopsis spp.* Fp-04/99, а также *Trametes spp.* В 08/06.

Исследования показали, что все используемые тест-культуры чувствительны к метаболитам исследуемых штаммов, однако, степень чувствительности - неодинакова. Результаты противоплесневой активности приведены на рисунке 8.



А Б



В

Рисунок 8 – Диаметры зоны подавления роста тест-организмов спиртовыми и водными экстрактами штаммов:

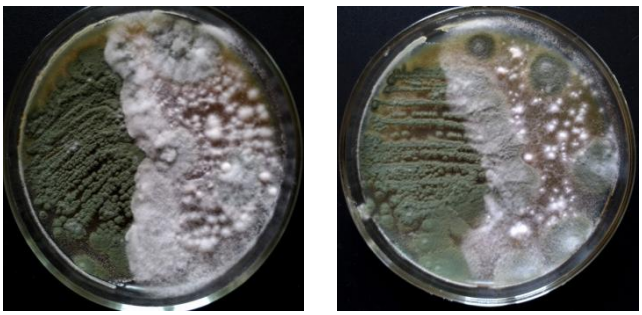
А - *Trametes spp.* В 08/06, Б - *Fomitopsis spp.* Fp-04/99, В - *Fomitopsis spp.* Tyv-2006

Исследования показали, что тест-организмы не проявляют чувствительность к культуральным фильтратам всех исследуемых штаммов. Однако все штаммы в биомассе мицелия синтезируют противоплесневые соединения, которые экстрагируются этанолом. Полученные результаты показали, что спиртовые экстракты мицелия *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* В 08/06 обладают активностью в отношении всех тест-культур микромицетов рода *Penicillium*.

Водные экстракты исследуемых штаммов обладают избирательной активностью: экстракты *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 оказывают негативное действие на рост микромицетов *P. commune, P. roqueforti; Fomitopsis spp.* Fp-

04/99 - на штаммы *P. commune*, *P. roqueforti*, *P. polonicum*, *P. nalgiovense*, а *Trametes spp.* В 08/06 – на штаммы *P. commune*, *P. brevicompactum*. Максимальную антифугальную активность показали спиртовые экстракты штамма *Fomitopsis spp.* Tyv-2006.

Особый интерес представляют полученные результаты по изучению миколитической активности штаммов базидиомицетов. Все изучаемые штаммы базидиомицетов показали наличие миколитической активности методом встречных культур. Установлено, что степень выраженности миколитической активности штаммов нарастает по мере увеличения площади роста базидиомицета и продолжительности инкубирования после засева. В первые 72 часа площадь роста мицелия исследуемых штаммов базидиомицетов, как правило, незначительна, в то время как площадь колонизации субстрата штаммов микромицетов рода *Penicillium* значительно опережает таковую у базидиомицетов. Однако по мере дальнейшего культивирования штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* В 08/06 задерживают рост плесневых грибов, а затем нарастают на мицелий микромицетов, в дальнейшем его полностью лизируя (рисунок 9).



А Б

Рисунок 9 – Миколитическая активность *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 в отношении микромицетов рода *Penicillium*:

А – культивирование *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 с поэтапным подсевом штамма *P. brevicompactum* F-4481 на 7-е сутки; Б – культивирование *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 с поэтапным подсевом штамма *P. commune* F-4486 на 7-е сутки

Исследования показали, что в вариантах экспериментов (одновременное инокулирование базидиомицетов и поэтапный подсев микромицетов рода *Penicillium*) исследуемые штаммы проявляли активное миколитическое

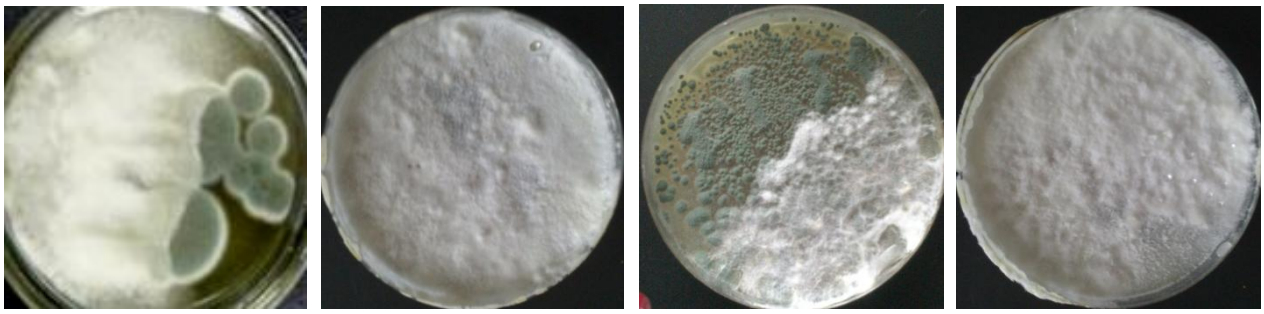
действие и за 6-7 суток полностью подавляли рост и развитие грибов рода *Pencillium* (рисунок 10).

А Б В Г

Рисунок 10 – Миколитическая активность *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 в отношении микромицетов рода *Penicillium*:

А – совместное культивирование *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и штамма *P. commune* F-4486 на 3-е сутки; Б - полное нарастание мицелия *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 на «газон мицелия» *P. commune* F-4486 на 7-е сутки сокультивирования; В - совместное культивирование *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и штамма *P. nalgiovense* F-4492 на 3-е сутки; Г - полное нарастание мицелия *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 на «газон мицелия» *P. nalgiovense* F-4492 на 7-е сутки сокультивирования

Максимальной миколитической активностью обладает штамм и *Trametes spp.* B 08/06, который останавливает рост всех исследуемых штаммов рода *Pencillium*, в том числе и наиболее устойчивого *P. polonicum*. Кроме того, он обладает наиболее высокой скоростью колонизации мицелия микромицетов рода *Pencillium* (рисунок 11).



А Б В Г

Рисунок 11 – Миколитическая активность *Trametes spp.* B 08/06 в отношении микромицетов рода *Penicillium*:

А – совместное культивирование *Trametes spp.* B 08/06 и штамма *P. nalgiovense* F-4492 на 3-е сутки; Б - полное нарастание мицелия *Trametes spp.* B 08/06 на «газон мицелия» *P. nalgiovense* F-4492 на 7-е сутки сокультивирования; В - совместное культивирование *Trametes spp.* B 08/06 и штамма P. *polonicum* F-4497 на 3-е сутки; Г - полное нарастание мицелия *Trametes spp.* B 08/06 на «газон мицелия» P. *polonicum* F-4497 на 7-е сутки сокультивирования

Таким образом, скрининг исследуемых штаммов базидиомицетов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и микромицетов рода *Penicillium*, показал, что наиболее высокую биологическую активность проявляют штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006**,** *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06, с которыми и проводились дальнейшие исследования.

ГЛАВА 4. КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНАТГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ШТАММОВ *FOMITOPSIS* И *TRAMETES*

4.1 Культурально-морфологические особенности штаммов

Основными показателями культурально-морфологических особенностей штаммов базидиомицетов является скорость роста и формирование воздушного мицелия на различных агаризованных питательных средах с органическими и неорганическими источниками азота.

Для подбора оптимальной среды штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 культивировали на средах: грибной агар; капустный агар №1; капустный агар №2; картофельно-декстрозный агар; картофельный агар; мальт-дрожжевой агар; морковный агар; овсяный агар; среда с гороховой мукой; среда Сабуро; среда Чапека; Maltax 10 с добавлением 1, 3 и 5% лиственничных опилок; Maltax 10 с молочной сывороткой, ранее не используемых для культивирования данных видов.

Оценка динамики роста колоний на агаризованных питательных средах для штаммов базидиомицетов показала, что максимальный прирост *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 отмечен на 28-е сутки культивирования и на 14-е – у штаммов *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 (ПРИЛОЖЕНИЕ 3).

В результате исследований была рассчитана линейная скорость роста и ростовой коэффициент мицелия штаммов, которые представлены в таблице 4. Из приведенных данных видно, что наиболее активно исследуемые штаммы росли на картофельно-декстрозном агаре, Maltax 10 с добавлением лиственничных опилок, причем увеличение содержания опилок от 1 до 5 % на характер формирования мицелия и скорость роста влияют незначительно, а минимальная скорость роста установлена на грибном агаре.

Таблица 4 - Ростовые показатели изучаемых штаммов на твердых агаризованных средах

Среда	Скорость роста на питательных средах (мм/сут) Ростовой коэффициент		
	Fomitopsis spp. Tyv-2006	*Fomitopsis spp.* Fp-04/99	*Trametes spp.* B 08/06
грибной агар	0,3±0,0 0,5**	1,4±0,1 7,6*	7,7±0,1 7,6*
капустный агар №1	0,4±0,0 0,8**	5,7±0,1 11,4*	6,6±0,1 6,7*
капустный агар №2	1,1±0,0 2,2*	6,2±0,1 12,5*	7,1±0,1 64,9*
картофельно-декстрозный агар	1,0±0,1 2,1**	10,6±0,1 21,3*	12,5±0,1 74,8*
картофельный агар	0,7±0,1 0,9**	10,5±0,2 12,9*	12,4±0,1 29,9*
мальт-дрожжевой агар	0,5±0,1 1,1**	3,6±0,1 10,8*	10,2±0,2 35,8*
морковный агар	0,2±0,0 0,3**	8,5±0,1 17*	12,4±0,1 74,6*
овсяный агар	0,7±0,1 1,0**	8,3±0,1 26,7*	12,0±0,1 72*
среда с гороховой мукой	0,7±0,0 1,5**	0,7±0,1 2*	11,6±0,2 62,8*
среда Сабуро	0,5±0,0 1,1**	2,1±0,1 6,3*	12,4±0,1 44,8*
среда Чапека	0,6±0,0 1,7**	6,9±0,2 4,9*	11,3±0,6 6,7*
Maltax 10 с добавлением 1% лиственничных опилок	1,3±0,1 10,1**	7,4±0,1 19,6*	12,4±0,1 74,4*
Maltax 10 с добавлением 3% лиственничных опилок	1,6±0,1 9,8	6,7±0,2 27,9*	12,4±0,1 74,4*
Maltax 10 с добавлением 5% лиственничных опилок	1,3±0,1 7,6**	9,2±0,1 27,6*	12,5±0 75*
Maltax 10 с молочной сывороткой	1,3±0,0 2,1**	6,8±0,1 20,3*	8,1±0,1 29,2*
*- Ростовой коэффициент измеряли, на 6 сутки культивирования ** - Ростовой коэффициент измеряли, на 14 сутки культивирования			

Учитывая ростовые коэффициенты, штамм *Trametes spp.* В 08/06 можно отнести к грибам растущим со средней скоростью, а штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 и *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 – к медленнорастущим грибам [16].

Наиболее благоприятными средами для культивирования штаммов рода *Fomitopsis* являются капустный агар с добавлением глюкозы и пептона, картофельно-декстрозный агар, сусловый агар с добавлением молочной сыворотки и различных концентраций лиственничных опилок. Для штамма *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 можно отметить также хорошие показатели роста на картофельном и овсяном агаре. Использование грибного агара и среды Сабуро для культивирования штаммов данного рода нецелесообразно.

Наиболее благоприятными средами для роста штамма *Trametes spp.* В 08/06 является картофельно-декстрозный, морковный и овсяный агар, а также сусло-агар с добавлением различных концентраций лиственничных опилок. Соответственно, для культивирования данного штамма нецелесообразно использовать грибной агар, капустный агар с добавлением кукурузной муки и среду Чапека (ПРИЛОЖЕНИЕ 3). Морфология исследуемых штаммов представлена на рисунке 12.

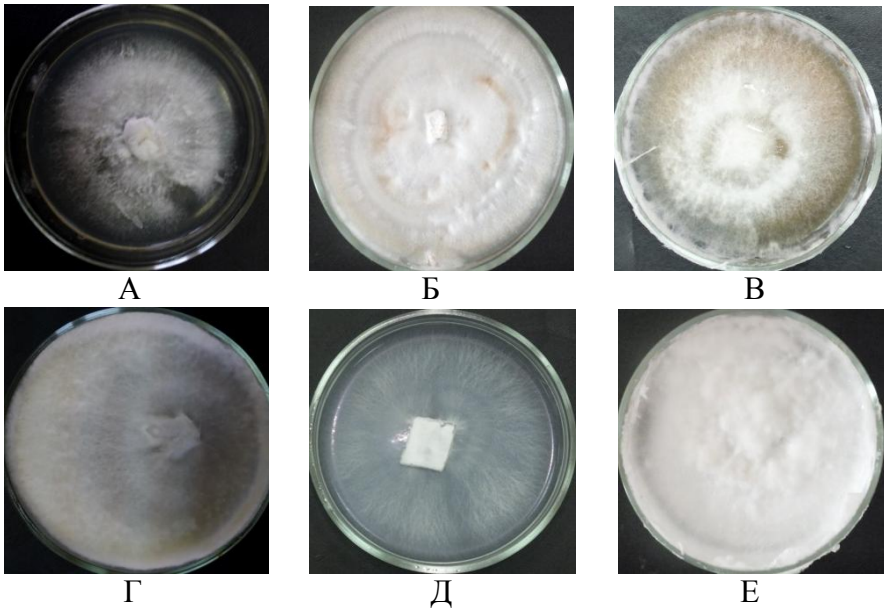


Рисунок 12 - Морфология роста мицелия штаммов на конец срока культивирования на агаризованных средах:

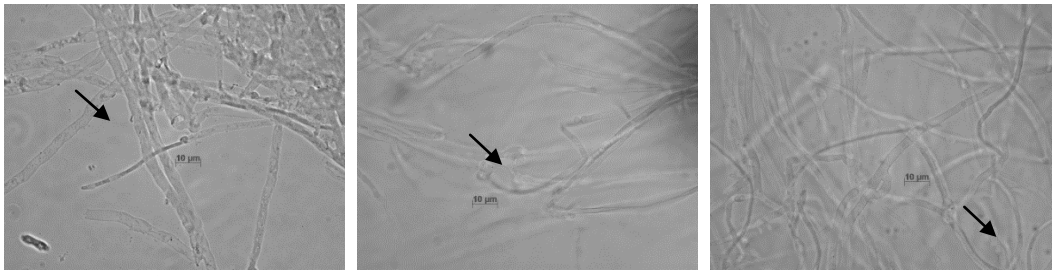
А - *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 на морковном агаре; Б - *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 на овсяном агаре; В - *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 на Maltax 10 с добавлением 3% опилок; Г - *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 на гороховом агаре; Д - *Trametes spp.* В 08/06 на среде Чапека; Е - *Trametes spp.* В 08/06 на капустном агаре № 2

Характер формирования воздушного мицелия в зависимости от питательной среды проявлялся не одинаково. Так штамм *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 при культивировании на всех средах образует молочно-белый легкий воздушный мицелий с различной плотностью и выраженной концентрической зональностью, на котором по мере старения культуры выделяются коричневые пигменты. Однако, на овсяном агаре данный штамм образует плотный кремовый войлочный мицелий.

Для штамма *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 был характерен белый плотный войлочный мицелий с ровными краями с выраженной концентрической зональностью, но на сусло-агаре с добавлением опилок исследуемый штамм формировал белый воздушный ватный мицелий средней плотности.

На среде Чапека штаммы *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 формировали белый тонкий нитевидный мицелий с низкой плотностью и неровными краями. Но на остальных агаризованных средах штамм *Trametes spp.* B 08/06 формировал белый ватный мицелий с высокой плотностью, ровными краями и без четко выраженной зональности.

Исследование микроморфологии антагонистически активных штаммов при помощи сканирующей электронной микроскопии показало, что штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 образуют сильно разветвленный, септированный мицелий с многочисленными пряжками (рисунок 13).

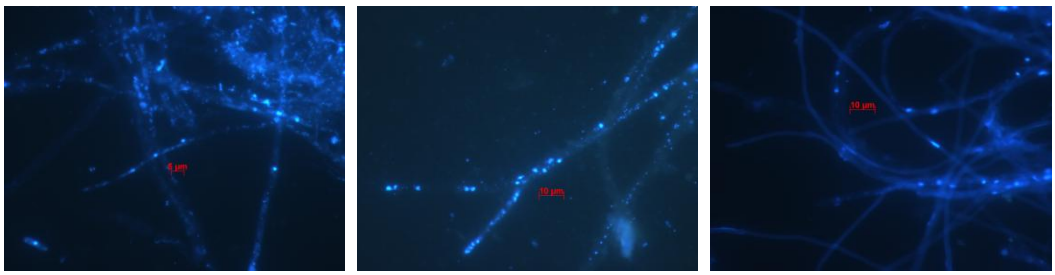


А Б В

Рисунок 13 – Микроморфология антагонистически активных штаммов, стрелками указаны пряжки (сканирующая электронная микроскопия):

А - *Fomitopsis spp.* Tyv-2006; Б - *Fomitopsis spp.* Fp-04/99; В - *Trametes spp.* B 08/06

Установлено, что исследуемые штаммы базидиормицетов образают дикариотический мицелий – ядра в гифах расположены попарно (рисунок 14).



А Б В

Рисунок 14 – Микроморфология ядер антагонистически активных штаммов (люминисцентная микроскопия):

А - *Fomitopsis spp*. Tyv-2006; Б - *Fomitopsis spp*. Fp-04/99; В - *Trametes spp.* B 08/06

4.2 Молекулярно-генетические свойства штаммов

Согласно, полученным результатам исследований морфолого-культуральных и микроморфологических свойств, штаммы *Fomitopsis spp.* Tyv-2006, *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 и *Trametes spp.* B 08/06 предварительно идентифицировали как относящиеся к видам *Fomitopsis officinalis***,** *Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor*, соответственно. Для дальнейшей идентификации целесообразно было провести молекулярно-генетические исследования.

При секвенировании вариабельных участков ITS рДНК штамма *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 была получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

GAAAAANGGGGTCGCCCCTNGTCACAACACACCCCTGNTGCACGTTGAAGGCCCGGCT
CGTTGAGTGGGTGGGCGACCGCCCAGGATTCGTAGCCTCGCTTTCTTACACAAACTTCG
GAATGTACATCAGAATGTCTTACGCGTGTAACGCATCGTAATATAACTTTCAGCAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGCATTCCGA
GGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAACGCGCAACCCCTGCCATCTTTGCGGATGAG
CGTCGGTTGGATTTTGGAGGTTGCCGGACTCGTTCGGCTCCTCTTGAAAGCATAGTGAA
GCTTGGACCTGACCGACCGAGTGGACGTGATAGAAAGTCACCGTCGACTGAAGGGTCC
GTCGTTGAACGGTTCAAGCTTTGTTTCATCGTCTTCGGACGAAACATCTCTGACCTCTG
ACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGA.

Скрининг по базе данных GenBank показал, что гомология исследуемого штамма с видом *Fomitopsis officinalis* составляет 70 %.

При секвенировании вариабельных участков ITS рДНК штамма *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 была получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

AAGGGTGTAGCTGGCCGTTTCGTTTGAGCGGCATGTGCACGCCCTGATCATTATCCATC
TCACACACCTGTGCACACACTGTAGGTCGGCTTTTGATTGGAGTGGGGTCTTCATCGAC
TCTGCTTTTTAGTTGGGGCCTTCCTATGTTTTATCACACACTACTTCAGTTAAAAGAATG
TCCTCTTGCGTCTAACGCATTTAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGC
ATGGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGA
GTGTCATGGAATTCTCAACTCTATTTGCTTTTGTGAATAGAGCTTGGACTTGGAGGTTT
ATTGCCGGTACCTGTGATCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGAACCTTTTGTGGATC
AGCTTA.

Скрининг по базе данных GenBank показал, что гомология исследуемого штамма с видом *Fomitopsis pinicola* составляет 98 %.

При секвенировании вариабельных участков ITS рДНК штамма *Trametes spp.* B 08/06 была получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

ACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTG
TGCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTAT
ACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAAC
TTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTAAT
TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTT
GTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGTTGGTCGGCTCCTCTTGAA
TGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGAC
CGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTTAACATCTGACC
TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

Скрининг по базе данных GenBank показал, что гомология исследуемого штамма с видом *Trametes versicolor* составляет 99 %.

Таким образом, исследование культуральных признаков, микроморфологии и молекулярно-генетических свойств показали принадлежность**:** штамма *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 – к виду *Fomitopsis officinalis*, штамма *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 – к виду *Fomitopsis pinicola* и штамма *Trametes spp.* B 08/06 – к виду *Trametes versicolor*.

4.3 Твердофазное культивирование штаммов на растительных субстратах

В основном твердые растительные субстраты используют для культивирования съедобных грибов, таких как *Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus*. Однако, потенциал биохимического состава базидиомицетов позволяет также использовать их в кормепроизводстве, для обеспечения полноценности и сбалансированности кормов [50]. В настоящее время используемые корма для сельскохозяйственных животных содержат в большом количестве клетчатку, которую животные не способны переваривать. Поэтому ферменты на основе грибных целлюлаз все шире используются в животноводстве для предварительной обработки сырья. Так создана кормовая добавка «Флекс 400» на основе гриба *Laetiporus sulphureus* [76]. Но данные об использовании видов *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis* и *Fomitopsis pinicola* в кормопроизводстве отсутствуют.

При культивировании исследуемых штаммов базидиомицетов на растительных субстратах было выявлено, что штаммы *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06 обладают высокой скоростью роста на всех исследуемых субстратах, за исключением опилок и лузги подсолнечника с добавлением кукурузной муки в соотношении 1:1 (ПРИЛОЖЕНИЕ 3). Штамм *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 проявляет среднюю скорость роста на всех твердых растительных субстратах кроме соломы. Общей закономерностью явилось то, что колонизация с момента инокуляции субстратов начиналась практически с первых суток культивирования (рисунок 15).

Из представленной диаграммы видно, что наилучшими субстратами по показателю колонизации субстратов штаммами *F. officinalis Tyv-2006* и *F. pinicola* Fp-04/99 является измельченное зерно пшеницы и опилки с добавлением ржаных отрубей (1:1) или кукурузной муки (2:1), в качестве дополнительного источника азотного питания.

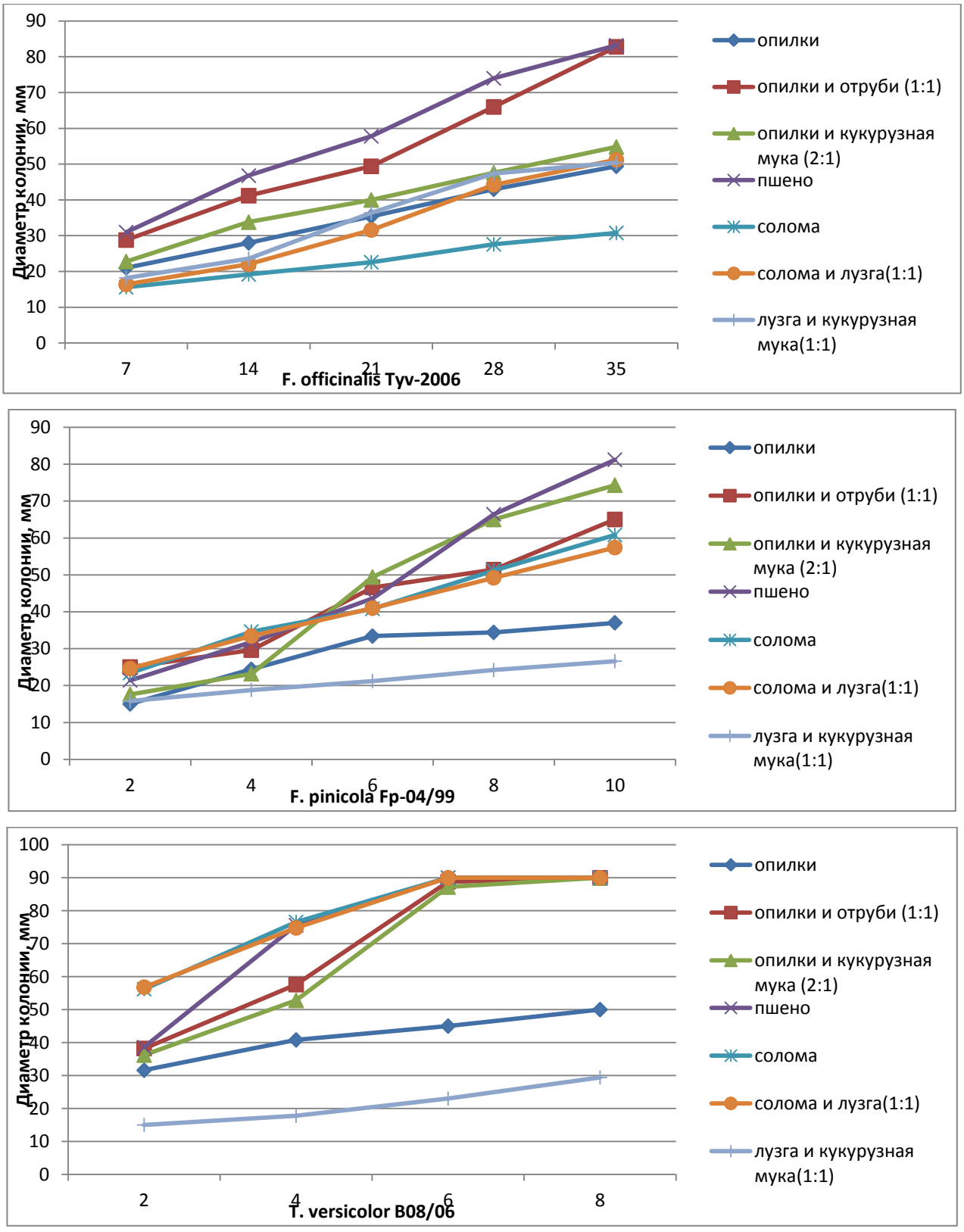


Рисунок 15 – Динамика колонизации растительных субстратов исследуемыми штаммами

Для штамма *T. versicolor* В 08/06 наиболее оптимальными по составу питательных веществ и способствующими высокой скорости роста явились субстраты: измельченное зерно пшеницы; солома с добавлением в соотношении 1:1 и без добавления лузги подсолнечника, причем добавление лузги подсолнечника в солому никак не влияет на скорость роста мицелия.

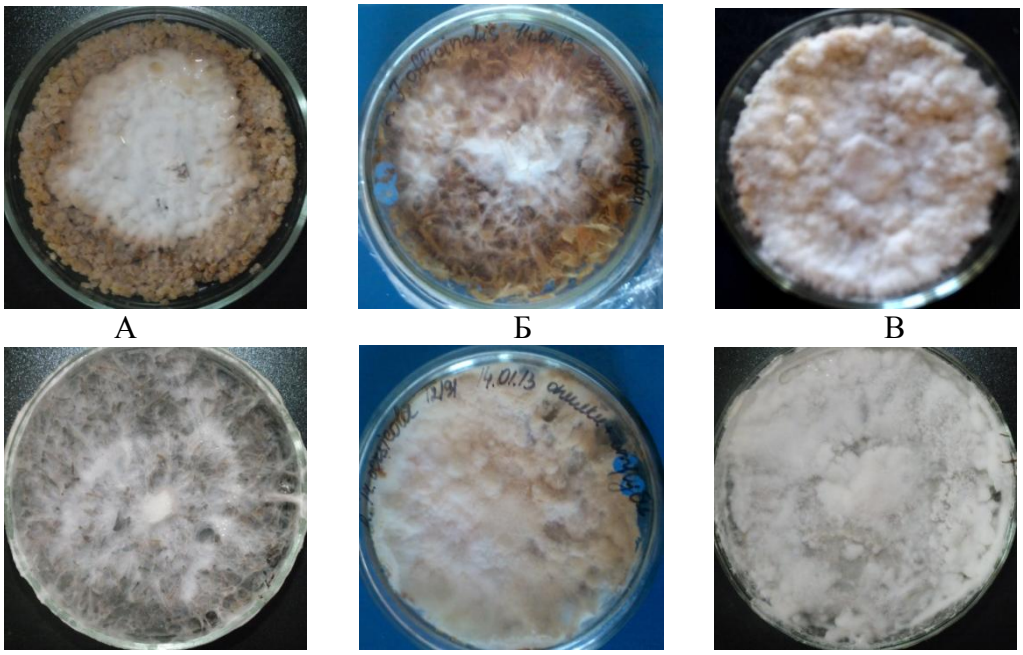
Однако, скорость роста исследуемых штаммов и характер формирования воздушного мицелия на различных субстратах были не одинаковы (таблица 5).

Таблица 5 - Ростовые показатели изучаемых штаммов на твердых растительных субстратах

Среда	Скорость роста на питательных средах (мм/сут) Ростовой коэффициент		
	F. officinalis	*F. pinicola*	*T. versicolor*
Опилки лиственничных пород	0,9±0,1 5,6**	3,1±0,2 18,4*	5,0±0,2 30,0*
Опилки лиственничных пород и ржаные отруби (1:1)	1,9±0,1 11,2**	5,3±0,2 31,6*	12,3±0,2 110,7*
Опилки лиственничных пород и кукурузная мука (2:1)	1,3±0,1 8,1**	5,7±0,1 34,4*	12,0±0,2 108,3*
Пшено	2,3±0,1 13,6**	4,8±0,1 28,6*	12,5±0 75,0*
Солома	0,3±0,0 0,5**	4,3±0,1 25,8*	12,5±0 75,0*
Солома и лузга подсолнечника (1:1)	0,5±0,1 1,5**	4,3±0,1 26,0*	12,5±0 75,0*
Лузга подсолнечника и кукурузная мука (1:1)	0,6±0,0 3,7*	1,0±0,1 6,2*	1,33±0,1 8,0*
*- Ростовой коэффициент измеряли, на 6 сутки культивирования ** - Ростовой коэффициент измеряли, на 14 сутки культивирования			

При росте исследуемых грибов на опилках лиственничных пород с добавлением ржаных отрубей (1:1) или кукурузной муки (2:1) у всех штаммов формируется плотный, ватный мицелий, различающийся только по высоте, в то время как на опилках без добавления дополнительного источника азотного питания мицелий формируется тонкий паутинообразный. При культивировании

на измельченных зернах пшеницы все три штамма образуют обильный, плотный войлочный мицелий высотой 2,0-3,0 мм. При росте штаммов *F. officinalis* Tyv-2006 и *F. pinicola* Fp-04/99 на соломе и соломе с добавлением лузги подсолнечника (1:1) формируется стелящийся паутинистый мицелий, в то время как у штамма *T. versicolor* B 08/06 – плотный и ватный. На лузге подсолнечника с добавлением кукурузной муки (1:1) у всех трех штаммов наблюдался тонкий паутинистый мицелий. Морфология роста исследуемых штаммов на твердых растительных субстратах представлена на рисунке 16.



А Б В

Г Д Е

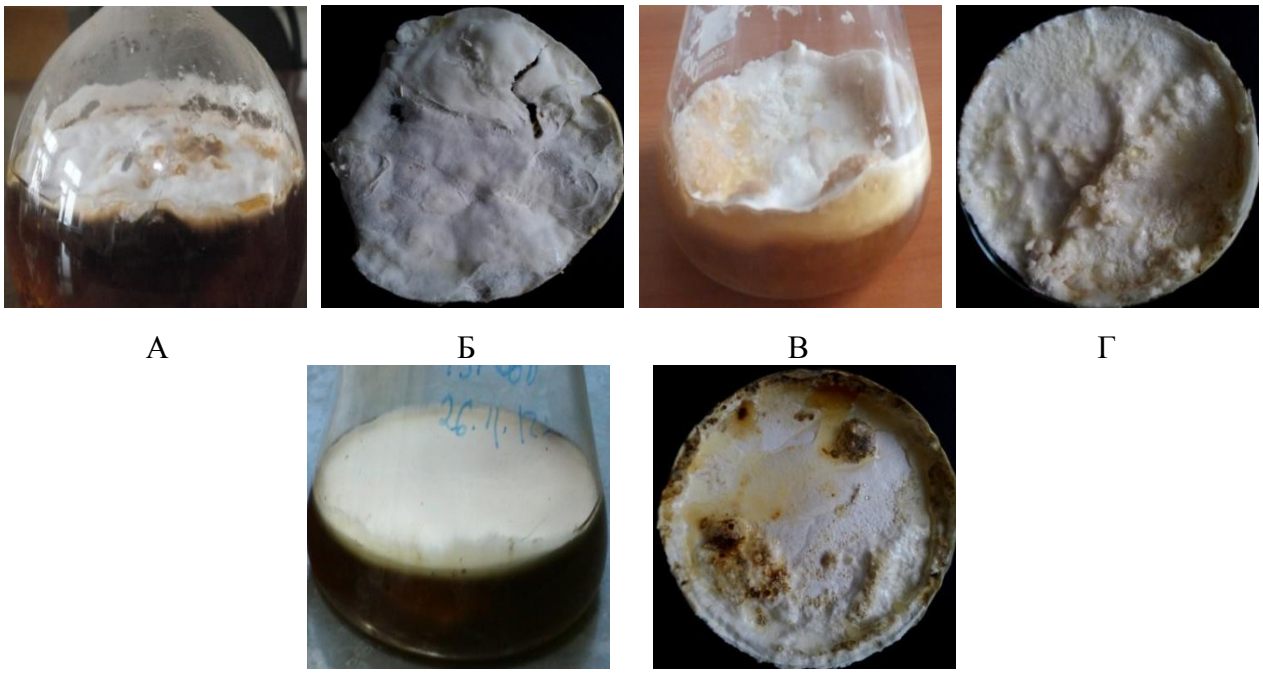
Рисунок 16 - Характер роста воздушного мицелия исследуемых штаммов на твердых растительных субстратах:

А – *F. officinalis* Tyv-2006 на пшене; Б – *F. officinalis* Tyv-2006 на опилках с ржаными отрубями; В - *F. pinicola* Fp-04/99 на пшене; Г - *F. pinicola* Fp-04/99 на соломе с лузгой подсолнечника; Д – *T. versicolor* B 08/06 на опилках с ржаными отрубями; Е - *T. versicolor* B 08/06 на соломе

4.4 Динамика накопления биомассы при жидкофазном культивировании штаммов

Динамика накопления биомассы штаммами при жидкофазном культивировании является одним из основных показателей при получении добавок различного назначения.

Интенсивность развития изучаемых штаммов можно оценить по накоплению биомассы мицелия при выращивании на жидких питательных средах, в связи с тем, что на плотных питательных средах при равном диаметре колонии отличаются по высоте и плотности мицелия. Рост культуры штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06 при поверхностном жидкофазном культивировании представляет собой пленку на поверхности жидкой среды (рисунок 17).



А Б В Г

Д Е

Рисунок 17 –Формирование мицелиальной пленки изучаемыми штаммами при статическом жидкофазном культивировании:

А – рост штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 на жидкой среде; Б – пленка штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 после культивирования; В - рост штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 на жидкой среде; Г - пленка штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 после культивирования; Д - рост штамма *Trametes versicolor* B08/06 на жидкой среде; Е - пленка штамма *Trametes versicolor* B08/06 после культивирования

Продуктивность штаммов исследовали при статическом жидкофазном культивировании на среде Maltax 10, которая ранее не была использована в научных исследованиях и не рекомендована для получения мицелия базидиомицетов в промышленности. Исследования показали, что при статическом жидкофазном культивировании наибольшее накопление биомассы происходит у штамма *Trametes versicolor* B 08/06 на 28 сутки статического

культивирования и составляет 4,7 г/л, что также подтверждается и его высокой скоростью роста на агаризованных средах, в то время как штаммы *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 и *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 достигают стационарной фазы роста только на 35 сутки культивирования и выход биомассы составляет 2,9 и 3,1 г/л, соответственно (рисунок 18; ПРИЛОЖЕНИЕ 4).

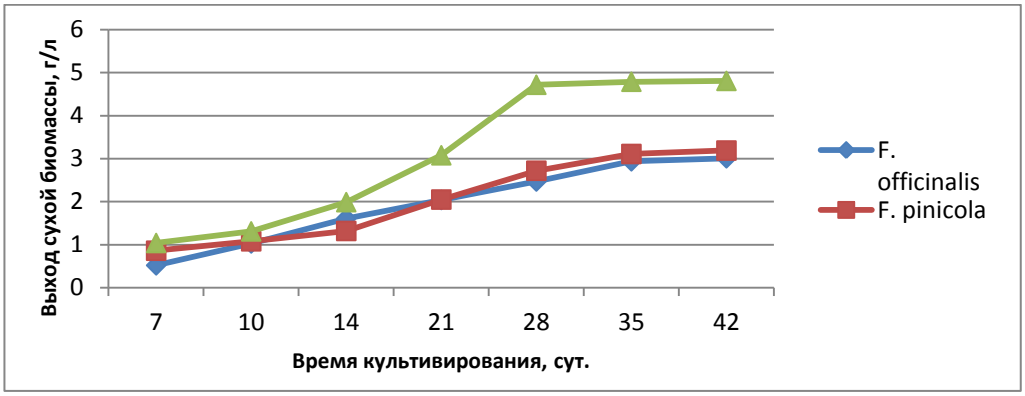


Рисунок 18 – Динамика накопления биомассы мицелия исследуемыми штаммами при статическом жидкофазном культивировании на среде Maltax 10

Для штамма *T. versicolor* B 08/06, имеющего наибольший выход биомассы из исследуемых штаммов, было проведено исследование накопления мицелиальной массы в условиях погруженного культивирования. Показано, что данный штамм при погруженном культивировании выходит на стационарную фазу на 8 сутки культивирования; выход биомассы составляет 11,6 г/л (рисунок 19). При дальнейшем культивировании прироста биомассы не отмечено.

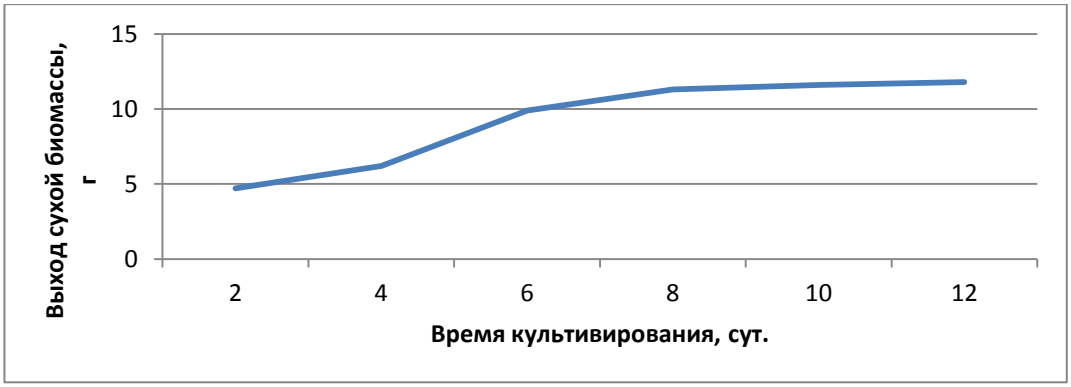


Рисунок 19 - Динамика накопления биомассы мицелием штамма *T. versicolor* B 08/06 при погруженном жидкофазном культивировании на среде Maltax 10

4.5 Ферментная активность штаммов

В ходе изучения хитиназной и целлюлазной активности культуральных жидкостей исследуемых микроорганизмов было показано их наличие для всех штаммов (рисунок 20). Наибольшая хитиназная активность наблюдалась у штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 (12,4 ед/мл), а наименьшая – у штамма *Trametes versicolor* B 08/06 (9,1 ед/мл). Исследование целлюлазной активности показало ее наибольшее количество у культурального фильтрата штамма *F. pinicola* Fp-04/99 (16,4 ед/мл), а у штаммов *F. officinalis* Tyv-2006 и *T. versicolor* B 08/06 - 13, 8 и 13,1 ед/мл, соответственно.

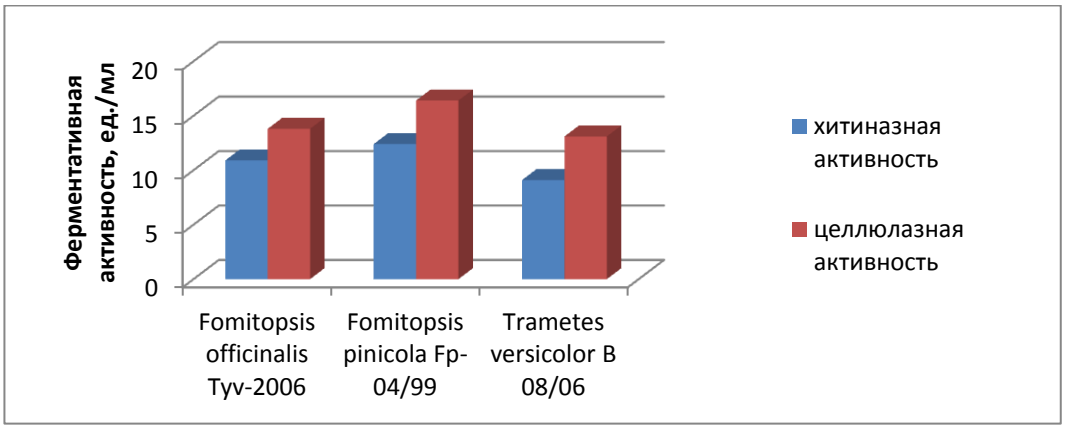


Рисунок 20 - Значения хитиназной и целлюлолазной активности исследуемых штаммов

Как показано в данной главе, все исследуемые штаммы обладают хитиназной и целлюлазной активностью и имеют высокие показатели роста на твердых растительных субстратах, что предполагает возможность их использования в сельском хозяйстве для биоконверсии растительных отходов в кормопроизводстве.

ГЛАВА 5.ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ШТАММОВ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* TYV-2006, *FOMITOPSIS PINICOLA* FP-04/99 И *TRAMETES VERSICOLOR* B 08/06

Физические воздействия, такие как свет, в видимой части спектра или звук низкой частоты, в современных технологиях используют в качестве природных и экологически чистых факторов регулирования [23]. Так, инфраскрасные лучи в определенных дозах используют для усиления роста культур некоторых видов лекарственных грибов, например *Coriolus vaporarius, Serpula laccrimans*. Исследования, проводящиеся в последние время, посвящены использованию света для ускорения роста мицелия съедобных базидиомицетов видов: *P. ostreatus, L. edodes*, и показывают эффективность этого фактора при колонизации субстрата и в выходе плодовых тел [94]. Исследования по влиянию света на ростовые показатели мицелия представителей грибов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* отсутствуют, хотя имеются данные о стимуляции базидиоспор *Coriolus versicolor* для получения мицелия [111].

Воздействие звуковыми волнами в слышимом диапазоне частот изучают в основном на таких биологических объектах, как зерновые культуры, с целью улучшения качества зерна и повышения его сорта [52, 53]. Информация о влиянии звука низкой частоты на динамику роста мицелия грибов видов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola, Trametes versicolor* также отсутствует.

5.1 Влияние оптических излучений на показатели роста штаммов

Установлено, что при облучении когерентным светом с экспозиционной дозой 1,8 Дж и 0, 36 Дж у штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 и *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 не наблюдается достоверных отличий от скорости роста и ростовых коэффициентов у контрольных без облучения, однако, у штамма *Trametes versicolor* B 08/06 скорость роста увеличивается на 3,5-4,4 мм/сут., а

ростовой коэффициент при трехкратном облучении экспозиционной дозой в 1,8 Дж равен 213,8, что почти в три раза больше, чем в контроле без облучения (ПРИЛОЖЕНИЕ 5). Сравнительная оценка показателей роста штаммов *F. officinalis* Tyv-2006, *F. pinicola* Fp-04/99 и *T. versicolor* B08/06 при облучении когерентным светом с экспозиционной дозой 1,8 Дж и 0, 36 Дж представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Показатели роста штаммов при воздействии когерентного света с различной экспозиционной дозой

Экспозиционная доза	Скорость роста (мм/сут) Ростовой коэффициент		
	F. officinalis	*F. pinicola*	*T. versicolor*
1,8 Дж×1	1,9±0,0 11,7**	9,2±0,2 36,8*	18,4±0,2 154,6*
1,8 Дж×2	2,0±0,1 12,2**	10,1±0,1 40,6*	18,4±0,6 143,5*
1,8 Дж×3	1,9±0,0 11,8**	10,7±0,2 42,8*	18,8±0 213,8*
0,36 Дж×1	1,7±0,1 10,5**	9,9±0,2 39,6**	17,2±0,2 103,2*
0,36 Дж×2	1,7±0,0 10,0**	9,6±0,1 38,0*	17,9±0,3 193,9*
0,36 Дж×3	2,0±0,0 12,0**	10,1±0,1 40,4*	17,7±0,2 169,4*
контроль	1,6±0,1 9,5**	8,5±0,2 33,8*	13,9±0,1 74,8*
*- Ростовой коэффициент измеряли, на 4 сутки культивирования ** - Ростовой коэффициент измеряли, на 14 сутки культивирования			

При этом мицелий у штамма *T.versicolor* B 08/06 формируется более плотным и высоким (рисунок 21).

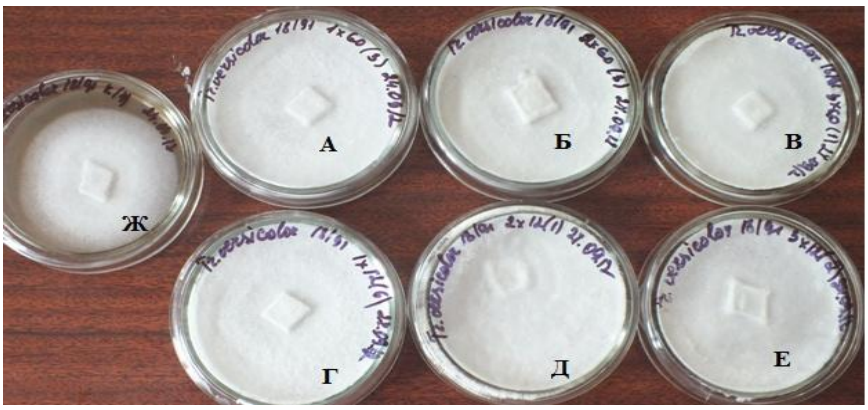


Рисунок 21 – Рост колоний штамма *Trametes versicolor* В 08/06 на 7-е сутки культивирования с облучением когерентным светом:

А – экспозиционная доза 1,8 Дж×1; Б - экспозиционная доза 1,8 Дж×2; В - экспозиционная доза 1,8 Дж×3; Г - экспозиционная доза 0,36 Дж×1; Д - экспозиционная доза 0,36 Дж×2; Е - экспозиционная доза 0,36 Дж×3; Ж – контроль без облучения

Для сравнения было проведено также облучение всех исследуемых штаммов некогерентным светом с разными длинами волн и разной мощностью (таблица 7).

Таблица 7 – Показатели роста штаммов при воздействии некогерентного света с различными длинами волн

	λ=400 нм	λ=461 нм	λ=467 нм	λ=496 нм	λ=518 нм	λ=578 нм	контр.
F. officinalis Tyv-2006							
Ростовой коэффициент 14 сут.	13,8	14,4	13,4	12,9	11,1	11,4	9,5
Среднесут. прирост, мм	2,3±0,1	2,4±0,0	2,2±0,1	2,2±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,6±0,1
F. pinicola Fp-04/99							
Ростовой коэффициент 4 сут.	53,7	58,8	54,6	52,2	57,6	60,0	33,8
Среднесут. прирост, мм	8,9±0,3	9,8±0,2	9,1±0,1	8,7±0,2	9,6±0,2	10,0±0,2	8,5±0,2
T. versicolor B 08/06							
Ростовой коэффициент 4 сут.	166,9	160,7	158,9	162,5	160,2	161,1	74,8
Среднесут. прирост, мм	18,2±0,3	18,6±0,3	17,7±0,1	17,9±0,1	17,9±0,2	17,8±0,1	13,9±0,1

Установлено, что при облучении некогерентным светом у штаммов *F. officinalis* Tyv-2006 и *F. pinicola* Fp-04/99 не наблюдается достоверных отличий среднесуточного прироста и ростовых коэффициентов, в то время, как у штамма *T. versicolor* B 08/06 среднесуточный прирост на 4-5 мм больше, чем в варианте без облучения, а ростовой коэффициент в два раза больше, чем в контроле. Также было установлено, что по мере старения культуры у штаммов *F. pinicola* и *T. versicolor* на 45 и 30 сутки культивирования, соответственно, наблюдалось формирование примордий, причем как у мицелия, облученного когерентным светом, так и некогерентным, в отличие от контрольных образцов без облучения (рисунок 22).

А Б В

Рисунок 22 – Рост колоний штамма *Trametes versicolor* B08/06 на 30-е сутки культивирования:

А - с облучением когерентным светом (экспозиционная доза 1,8 Дж×3); Б - с облучением некогерентным светом (длина волны λ=467 нм); В – контроль без облучения

На основании полученных данных было проведено облучение когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 Дж и культивирование исследуемых штаммов на жидкой среде Maltax 10. Динамика увеличения массы облученного мицелия представлена на рисунке 23. Сравнительная оценка показала, что выход биомассы для штамма *F. officinalis* Tyv-2006 увеличивается на 7% по сравнению с контролем, *F. pinicola* Fp-04/99 - на 8,5%, а для *T. versicolor* B 08/06 –на 11% (рисунок 24).

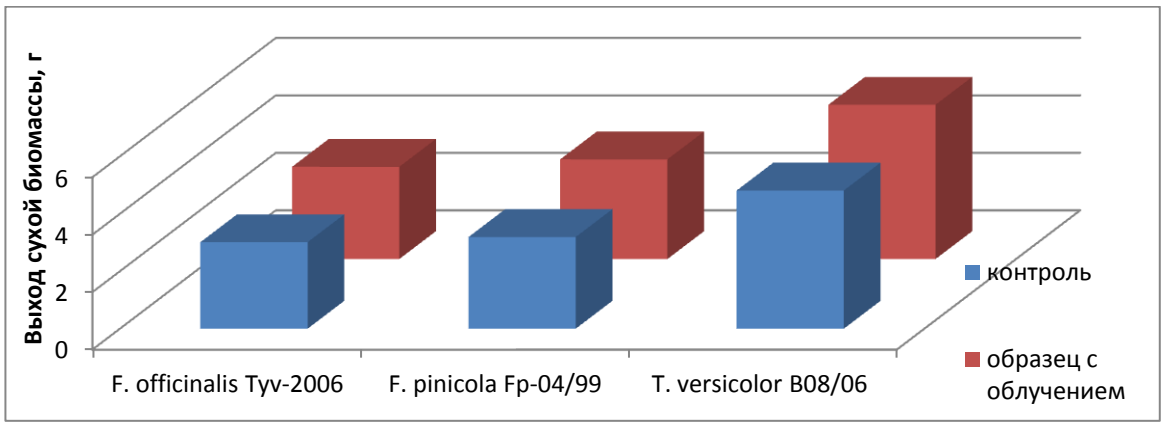
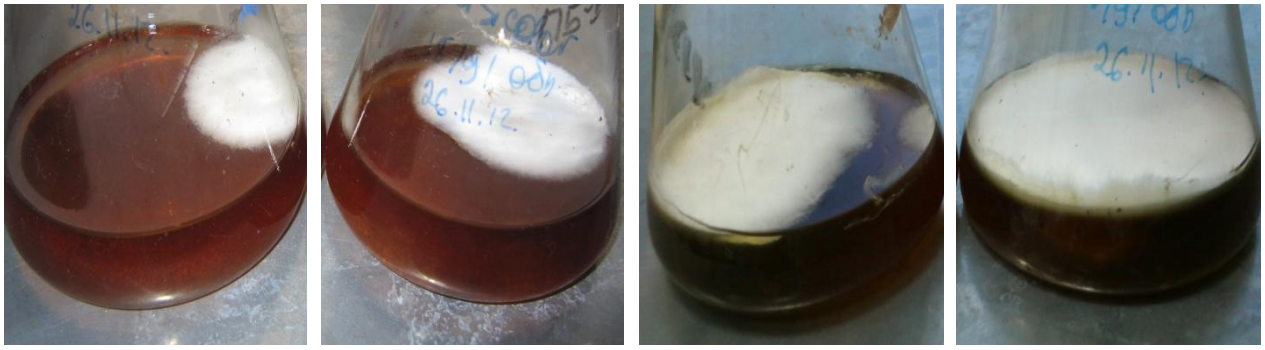


Рисунок 23 – Биомасса мицелия исследуемых штаммов при статическом жидкофазном культивировании на среде Maltax 10 образцов облученных когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 Дж и контрольных без облучения



А Б В Г

Рисунок 24 – Рост мицелия *Trametes versicolor* B 08/06 на жидкой среде Maltax 10:

А - контроль без облучения на 7-е сутки культивирования; Б - после облучения когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 Дж на 7-е сутки культивирования; В – контроль без облучения на 21-е сутки культивирования; Г- после облучения когерентным светом с экспозиционной дозой 0,36 Дж на 21-е сутки культивирования

5.2 Влияние акустических волн на показатели роста штаммов

Оценка динамики роста штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* при влиянии на них звуковых волн низкой частоты показала, что у базидиомицетов *F. officinalis* и *F. pinicola* происходит не достоверное различие значений среднесуточного прироста и ростовых коэффициентов, тогда как у *T. versicolor* ростовой коэффициент увеличивается в 1,5 раза при частотах в 1000 и

2000 Гц, которое происходит за счет увеличения роста мицелия, значения которого незначительно различаются у образцов обработанных акустическими волнами в слышимом диапазоне часот и контрольных (таблица 8, ПРИЛОЖЕНИЕ 6). Формирование примордий по мере старения культуры не наблюдалось.

Таблица 8 – Показатели роста штаммов при действии звуковых волн низкой частоты

Штамм	Среднесуточный прирост, мм Ростовой коэффициент			
	200 Гц	1000 Гц	2000 Гц	контроль
F. officinalis	1,8±0,0 9,8**	1,9±0,1 10,3**	1,9±0,1 10,2**	1,6±0,1 9,5**
F. pinicola	9,5±0,2 38,7*	10,3±0,1 40,8*	10,3±0,1 40,8*	8,5±0,1 33,8*
T. versicolor	15,2±0,1 86,6*	17,1±0,3 102,3*	17,1±0,0 105,2*	13,9±0,1 74,8*
*- Ростовой коэффициент измеряли, на 4 сутки культивирования ** - Ростовой коэффициент измеряли, на 14 сутки культивирования				

Проведенные исследования позволили определить влияние когерентного и некогерентного света, полученного из различных источников, а также акустических волн в слышимом диапазоне частот на линейный рост и накопление биомассы вегетативного мицелия исследуемых видов. Был получен четко выраженный фотобиологический эффект у штамма *Trametes versicolor* В 08/06, в связи с которым можно сделать выводы о возможности применения источников света в качестве стимуляторов роста при культивировании мицелия, в том числе и в промышленности.

ГЛАВА 6. БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* TYV-2006, *FOMITOPSIS PINICOLA* FP-04/99 И *TRAMETES VERSICOLOR* B 08/06

Изучению биохимического состава высших базидиомицетов посвященное большое количество экспериментальных работ, результаты которых представлены в ряде обзоров и монографий [156, 202, 234, 258]. В последнее время появились новые данные, дополняющие биохимический состав, как плодовых тел, так и мицелия широкого круга базидиальных макромицетов [60, 79].

Свежие плодовые тела грибов и мицелий содержат большое количество воды от 74 до 95% [149], в то время как сухая масса представлена белками, углеводами, в том числе и клетчаткой, жирами, минеральными веществами (золой). Причем содержание различных компонентов сухой массы для одного вида может варьироваться в значительных пределах, что можно объяснить процессами роста, средами и условиями культивирования [145, 166].

Одним из основных компонентов биохимического состава грибов и дефицитного компонента в питании людей является полноценный белок (включающий в себя пептиды и аминокислоты). В фундаментальной работе E. Crisan и A. Sands (1978) была проведена оценка качества белкового компонента грибов, в основе которой лежал анализ аминокислотного состава грибов. В ходе исследования было доказано, что биологическая ценность грибов в отдельных случаях может достигать уровня животных белков.

В плодовых телах и мицелии грибов относительно мало жиров, но значительное количество углеводов, которые представлены растворимыми сахарами, количество которых не более 10-15 %, но основная часть представлена полисахаридами, в которые входждит элемент клеточной стенки хитин, а также пигменты [149].

Для использования биомассы мицелия базидиомицетов как противомикробных препаратов в пищевых технологиях и в кормопроизводстве

имеет значение его качественный состав: количество белка, углеводов, липидов, витаминов, экстрактивных и минеральных веществ. Исследование этих показателей проводили по методикам, принятым в классической биохимии [116].

6.1 Качественный состав белка мицелия

Согласно исследованиям Г.К. Ковалевой (2009) количество общего белка в биомассе мицелия *F. officinalis* и *T. versicolor* незначительно увеличивается при культивировании и на 10, 20 и 30-е сутки составляет в пределах 5-10 %. В связи с этим, мы сочли целесообразным использовать для исследований мицелий 15-суточного возраста. Следует отметить, что в мицелии *F. officinalis* показатель белка в 10 раз больше, чем доля общего белка в плодовых телах, количество которого составляет только 1,53 % [77, 78].

Анализ результатов наших исследований показал, что общее содержание белка мицелия у штаммов *F. officinalis* Tyv-2006, *F. pinicola* Fp-04/99 и *T. versicolor* B 08/06 на абсолютно сухую биомассу (АСБ) составило 20,9; 26,2 и 17,8%, соответственно. При этом установлено, что в мицелии *F. officinalis* Tyv-2006 и *F. pinicola* Fp-04/99 на долю незаменимых аминокислот (кроме триптофана) приходится 24,5 и 22,9 %, соответственно, от общего количества аминокислот, а у штамма *T. versicolor* B 08/06 - 31,8%, что позволяет оценивать мицелий как высоко ценный пищевой компонент (таблица 9).

Из приведенной таблицы видно, что в белке мицелия исследуемых штаммов в наибольшем количестве присутствуют пролин, аспарагин и глутаминовая кислота.

Таблица 9 – Общее содержание аминокислот в биомассе исследуемых штаммов на 100 г белка

Название аминокислоты	Содержание аминоксилот, мг/100 г белка		
	F. officinalis	*F. pinicola*	*T. versicolor*
Asp	1,18	1,56	1,00
Thr	**0,69**	**0,82**	**0,60**
Ser	0,79	0,83	0,62
Glu	2,15	1,82	1,25
Pro	8,72	10,0	6,0
Gly	0,63	0,43	0,58
Ala	0,67	0,86	0,70
Cys	0,62	0,12	0,36
Val	**0,63**	**0,70**	**0,55**
Met	**0,24**	**0,25**	**0,17**
Ile	**0,49**	**0,48**	**0,43**
Leu	**0,91**	**0,91**	**0,74**
Tyr	**0,59**	**0,62**	**0,31**
Phe	**0,79**	**0,66**	**0,43**
Orn	0,26	0,34	0,83
Lys	**0,84**	**0,80**	**0,58**
His	0,38	0,62	0,22
Arg	0,66	1,36	0,68

Сравнительная оценка аминокислотного состава мицелиальной биомассы штаммов *F. officinalis* Tyv-2006, *F. pinicola* Fp-04/99 и *T. versicolor* B 08/06 показала, что наибольшее количество незаменимых аминокислот приходится на лейцин (0,74-0,91 г/100 г белка), треонин (0,60-0,82 г/100г), лизин (0,58-0,84 г/100г), играющих важную роль в организме животных и человека.

6.2 Содержание углеводов и глюканов в мицелии штаммов

Исследованиями ряда авторов установлено, что биологическая активность высших грибов, такая как иммуностимулирующий эффект,

антиканцерогенное действие, связаны с наличием в плодовых телах и вегетативном мицелии базидиомицетов углеводов, представленных трудногидролизуемыми и легкогидролизуемыми полисахаридами [228, 233]. Причем основными действующими соединениями являются β-глюканы, обладающие широким спектром действия, противораковым, антимикробным, иммуностимулирующим [122, 162].

Исследования углеводного состава штаммов показали, что наибольшее их количество приходится на штамм *T. versicolor* В 08/06 (57,1 %) (таблица 10).

Таблица 10 – Доля углеводов в мицелии изучаемых штаммов

Штаммы	Содержание полисахаридов в мицелии, %	
	Трудногидролизуемые полисахариды	Легкогидролизуемые полисахариды
F. officinalis Tyv-2006	16,5	6,7
F. pinicola Fp-04/99	28,3	9,9
T. versicolor B08/06	42,9	14,2

Из приведенной таблицы видно, что количество легкогидролизуемых полисахаридов значительно ниже у всех исследуемых штаммов, чем трудногидролизуемых.

Исследования по определению содержания глюканов в мицелии штаммов показали, что наибольшее их количество, как и углеводов, также приходится на штамм *T. versicolor* В 08/06 (41,2 %) (таблица 11).

Таблица 11 - Доля глюканов в мицелии изучаемых штаммов

Штаммы	Содержание глюканов в мицелии, %	Содержание α-глюканов в мицелии, %	Содержание β-глюканов в мицелии, %
F. officinalis Tyv-2006	9,9	5,4	4,5
F. pinicola Fp-04/99	27,7	16,4	11,3
T. versicolor B08/06	41,2	10,4	30,8

Из полученных данных видно, что у штаммов рода *Fomitomsis* среди общего количества глюканов преобладают α-глюканы, в то время как у штамма *Trametes versicolor* В 08/06 в мицелии обнаружено больше β-глюканов, которые, по мнению ряда авторов, отвечают за биологическую активность грибов данного вида.

6.3 Переваримость белка мицелия штаммов

При оценке биологической ценности белка всегда важно учитывать такой показатель как переваримость. Результаты по исследованию переваримости белка по пепсину изучаемых штаммов показали, что она лежит в пределах от 31,1 % для штамма *F. pinicola* Fp-04/99 до 41,9 % для штамма *T. versicolor* В 08/06, а по тирозину – от 40,3 % для штамма *F. pinicola* Fp-04/99 до 49,9 % для штамма *T. versicolor* В 08/06 (рисунок 25).

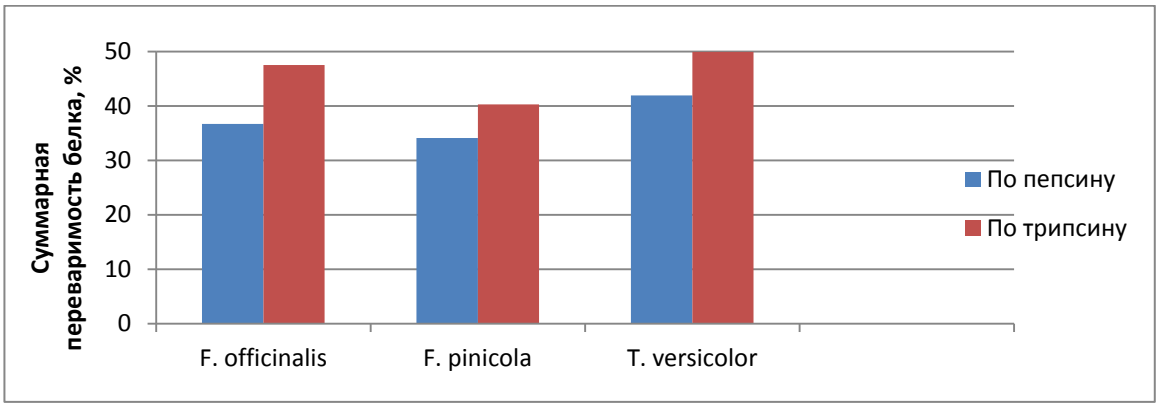


Рисунок 25 – Переваримость белка изучаемых штаммов

Суммарное количество тирозина по завершении двух стадий гидролиза составило: *F. officinalis* Tyv-2006 – 23,7 мг/г белка, *F. pinicola* Fp-04/99 – 17,6 мг/г белка, а у штамма *T. versicolor* В 08/06 – 15,9 мг/г белка.

Такие значения переваримости белка характерны для многих грибов, в связи с присутствием в тканях хитина, однако, ниже чем у продуктов растительного происхождения.

6.4 Оценка токсичности мицелия штаммов

Одной из перспективных и доступных современных методик по определению безопасности пищевых продуктов является биотестирование с использованием в качестве тест-объектов простейших, таких как *Tetrahymena pyriformis, Paramecium caudatum* и др. [119]. Данную методику можно использовать в качестве первого этапа проверки продукции на токсичность.

Степень токсичности водных и спиртовых экстрактов мицелия штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06 определяли на *Paramecium caudatum.*

Результаты исследований показали, что водные экстракты мицелия штаммов (мицелий:вода – 1:30) нетоксичны при соотношении экстракт:вода – 1:10 для штаммов *F. officinalis* Tyv-2006, *F. pinicola* Fp-04/99 и *T. versicolor* B 08/06 (коэффициент прироста 0,99, 0,96 и 1,0, соответственно). Спиртовые экстракты мицелия исследуемых штаммов (1 %-ный спирт) также нетоксичны только при соотношении экстракт:вода – 1:10, коэффициент прироста для них составляет от 0, 92 до 0,98 (таблица 12).

Таблица 12 – Влияние экстрактов мицелия базидиомицетов на продолжительность жизни *Paramecium caudatum*

	Степень токсичности				
	Исх. экстракт	1:1	1:3	1:5	1:10
K_1 выживаемости водных экстрактов мицелия штаммов					
F.officinalis	0	0,17	0,42	0,65	0,99
F. pinicola	0	0,17	0,4	0,6	0,96
T. versicolor	0	0,2	0,45	0,7	1,0
Контроль вода	1,9				
К1 выживаемости спиртовых экстрактов мицелия штаммов					
F.officinalis	0	0,12	0,4	0,55	0,93
F. pinicola	0	0,11	0,36	0,52	0,92
T. versicolor	0	0,16	0,44	0,67	0,98
Контроль 1 %-ный спирт	1,71				
Примечание:«≤0,5» культура клеток гибнет; «≥0,9» культура клеток жизнеспособна > 2 ч					

Для исследований на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* использовали разведение максимально нетоксичных концентраций водных и спиртовых экстрактов мицелия исследуемых штаммов в соотношении 1:10, соответственно (таблица 13).

Таблица 13 – Влияние экстрактов мицелия исследуемых штаммов на прирост численности культуры *Tetrahymena pyriformis*

Штамм	Количество исходных, клеток/300мкл	Количество клеток через 24ч, клеток/300мкл	Коэффициент прироста
Водный экстракт			
F. officinalis	168	508	3,02
F. pinicola	176	528	2,99
T. versicolor	110	340	3,09
Спиртовой экстракт			
F. officinalis	165	345	2,09
F. pinicola	161	342	2,16
T. versicolor	164	420	2,57
Вода (контроль)	163	197	1,22
1% спирт (контроль)	123	243	1,97

Из результатов приведенной таблицы можно сделать вывод, что экстракты штаммов *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* не обладают токсичным действием на культуру простейших *Tetrahymena pyriformis*, т.к. наблюдается прирост клеток через 24 часа. По коэффициенту прироста *Tetrahymena pyriformis,* который составил от 2,99 до 3,09 для водных экстрактов и от 2,09 до 2,57 для спиртовых экстрактов, можно утверждать об их биологической активности, влияющей на жизнеспособность инфузорий. Наибольший прирост культуры, как видно из таблицы 13, у водных экстрактов мицелия штамма.

Таким образом, по приведенным данным видно, что мицелий исследуемых штаммов *F. officinalis* Tyv-2006, *F. pinicola* Fp-04/99 и *T. versicolor* B08/06 может быть перспективным источником биологически активных веществ. Однако, при использовании биомассы базидиомицетов следует

учитывать биологическую ценность мицелия, которая определяется рядом факторов, в число которых входит аминокислотный состав. Потребление продуктов с повышенным содержанием пролина может способствовать обострению состояния у людей, страдающих аутизмом и шизофренией, а также за активацию токсичности глютена у людей страдающих целиакией, распространенным аутоиммунным заболеванием тонкого кишечника [84, 88].

Исходя из данных, по содержанию таких активных веществ как полисахариды, и глюканы, в частности, полученных в ходе исследований, мицелиальную массу исследуемых штаммов можно рекомендовать для получения функциональных пищевых продуктов и обогащенных кормов для сельскохозяйственных животных.

ГЛАВА 7. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИЦЕЛИЯ ШТАММА *TRAMETES VERSICOLOR* В 08/06 В ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Основываясь на данных, представленных в предыдущих главах, штаммы базидиомицетов *F. officinalis* и *F. pinicola* можно рекомендовать для использования в гидролизной промышленности и при производстве кормов и добавок к ним, в то время, как для применения в пищевой промышленности можно рекомендовать только штамм *Trametes versicolor* В 08/06, отличающийся высокой антимикробной и фунгицидной активностью, наличием высокго содержания белка, незаменимых аминокислот и углеводов, считающихся основными активными компонентами мицелия, низкой токсичностью в отношении инфузорий и средними ростовыми показателями, которые как показано в эксперименте, можно стимулировать когерентным и некогерентным светом, как при твердофазном, так и при жидкофазном культивировании (ПРИЛОЖЕНИЕ 7).

7.1 Испытание препарата мицелия для получения колбасной продукции

В современной мясной промышленности базидиальные грибы пока не нашли широкого применения. Плодовые тела *Agaricus bisporus и Pleurotus ostreatus* иногда используют в качестве «вставок» при производстве некоторых видов вареных колбас, паштетов, полуфабрикатов. Однако, потенциал использования плодовых тел, а также мицелия базидиомицетов в качестве обогатителей продуктов и заменителей искусственных пищевых довавок в мясной промышленности не раскрыт [58]. Поэтому актуально изучение возможности применения мицелия базидиальных грибов при производстве продукции в мясоперерабатывающей промышленности.

Для выработки колбасного продукта использовали, измельченную на гомогенизаторе до размера частиц 0,2-0,5 мм и высушенную до постоянной

массы, пленку гриба, полученную путем культивирования на жидкой питательной среде Maltax-10 в течение 14 суток. .Сухой препарат представляет хлопьевидный порошок бежевого цвета с нейтральным вкусом и выраженным грибным запахом (рисунок 26).

Рисунок 26 – Сухой препарат мицелия штамма *Trametes versicolor* В 08/06

Изучен химический состав препарата мицелия: массовая доля влаги составляла 5,5 %, белка - 17,8 %, жира – 3,0 %, золы 4,6 %, остальная часть сухих веществ представлена углеводами.

С целью определения степени совместимости препарата мицелия с другими высокомолекулярными ингредиентами рецептур мясопродуктов, обеспечивающими структурирование и термодинамическую устойчивость получаемых систем, на первом этапе работы были определены его функционально-технологические свойства.

Установлено, что, несмотря на относительно низкую набухаемость (147 %) и водосвязывающую способность (60 %), а также отсутствие выраженных гелеобразующих свойств, мицелий имеет достаточно высокую жироудерживающую способность (433,6 %) и может образовывать устойчивые эмульсии в соотношении мицелий:вода:масло (1:(1-2):(1-3)).

На втором этапе работы оценивали влияние препарата на основные показатели мясных систем (pH, структурно-механические свойства, водоудерживающую способность, органолептические показатели, величину термопотерь), в качестве которых использовали фарши ливерных колбас 1 сорта (ГОСТ Р-54646-2011), рецептура которой представлена в таблице 14.

Таблица 14 - Рецептура фарша ливерной колбасы 1 сорта (ГОСТ Р-54646-2011)

Сырьё несолёное	Масса, кг/100 кг	Пряности, материалы	Масса, г/100 кг несоленого сырья
Печень говяжья или жилованная сырая либо бланшированная	50	Соль поваренная пищевая	2000
		Лук репчатый свежий	1000
Щековина свиная или свинина жирная жилованные сырые либо бланшированные	50	Сахар-песок или глюкоза	130
		Перец черный или белый молотый	85
		Перец душистый или кориандр молотые	85
Бульон не более 10 дм^3			

Для изготовления ливерной колбасы 1 сорта печень тщательно жиловали, освобождали от крупных кровеносных сосудов, остатков жировой ткани, лимфатических узлов, желчных протоков. После жиловки печень измельчали на куски массой 300—500 г и бланшировали в открытых двустенных котлах в кипящей воде при соотношении печени и воды 1:3 в течение 15—20 минут до обесцвечивания. Из щековины свиной удаляли железы, лимфатические узлы, кровоподтеки и загрязнения. Щековину и мясо свиное жирное жилованные бланшировали в кипящей воде при периодическом перемешивании в течение 5—10 минут. После мясное сырье измельчали на волчке. Измельченное мясное сырье направляли в куттер, где к основному сырью добавляли водо-ледяную смесь, количество которой составляло 25 % от основной массы сырья, специи и предварительно гидратированный мицелий *T. versicolor,* в соотношении мицелия и воды 1:3. Готовым фаршем наполняли оболочки и направляли их в термокамеру.

Термическая обработка включала в себя варку и охлаждение. Варку проводили до готовности, т.е. до достижения температуры в центре продукта 72°С. Охлаждение колбас проводили путем их погружения на 25 - 30 минут в

холодную воду со льдом. Окончанием технологического процесса производства мясного продукта считали достижение температуры в толще продукта не выше 0-8 °С. Технологическая схема производства ливерной колбасы содержащей мицелий базидиомицета *Trametes versicolor* представлена на рисунке 27.

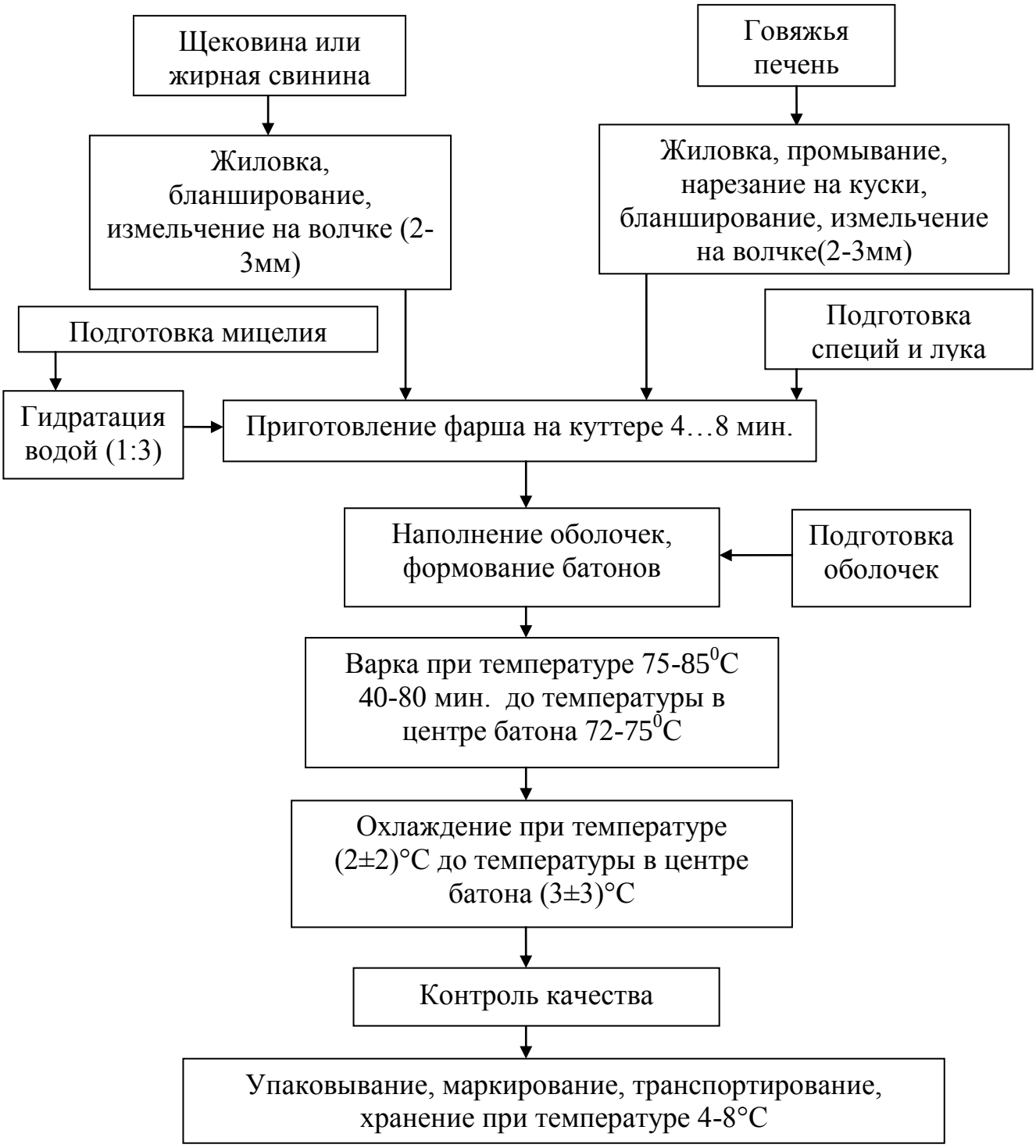


Рисунок 27 - Технологическая схема производства ливерной колбасы содержащей мицелий базидиомицета *Trametes versicolor* В 08/06

Дозировки введения мицелия в рецептуру составляли от 1 до 4 %. Вводили препарат мицелия на второй фазе куттерования после предварительной его гидратации (1:3) взамен адекватного количества входящей в состав рецептуры свиной щековины.

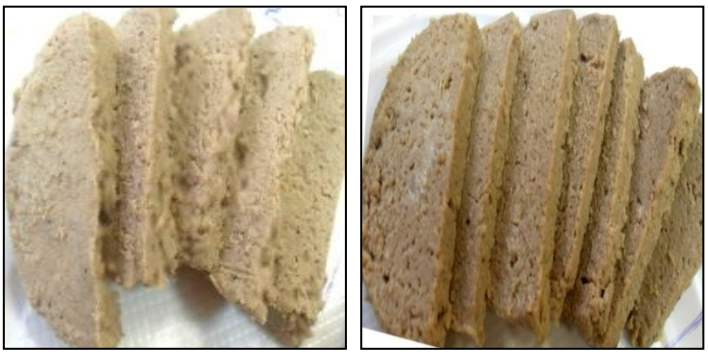
Результаты физико-химических исследований представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Влияние мицелия на физико-химические показатели модельных систем

Вид партии	Показатели			
	pH	ВУС, %	Пластичность, $см^2/г$	Потери при термообработке, % к массе
Контрольная	6,54	90,1	9,3	22,1
Опытные:				
- 1% мицелия	6,15	89,2	9,2	23,1
- 2% мицелия	5,95	87,2	9,2	23,7
- 3% мицелия	5,77	86,4	8,9	24,2
- 4% мицелия	5,48	82,2	8,4	25,5

Анализ полученных позволил сделать заключение о том, что введение мицелия в состав рецептуры ливерных колбас приводит к некоторому снижению pH среды, и, соответственно, к падению величины ВУС, ухудшению пластичности, росту потерь при термообработке. При этом можно отметить, что негативное влияние этих изменений на качественные показатели модельных систем и, в частности, на состояние монолитности и липкости фаршей, начинает существенно проявляться только при добавлении в рецептуры свыше 3 % препарата мицелия штамма В 08/06 *T. versicolor*, поэтому наиболее рациональным уровнем введения мицелия в рецептуры ливерных колбас был признан диапазон в 2 %.

На заключительном этапе на базе опытно-технологической станции кафедры технологии мяса и мясопродуктов МГУПП были изготовлены две партии ливерных колбас: контрольная и опытная – с введением 2 % мицелия (рисунок 28).



А Б

Рисунок 28 - Ливерная колбаса:

А – образец из контрольной партии, Б – образец из опытной партии с введением 2 % мицелия штамма *Trametes versicolor* B08/06

Сравнительная оценка комплекса физико-химических, технологических, органолептических и микробиологических показателей, характеризующих базовые показатели качества готовой продукции приводится в таблице 16.

Таблица 16 - Основные показатели качества ливерных колбас

Показатели	Вид образца	
	Контроль	Опыт
I. Физико-химические и структурно-механические Массовая доля, % - влага -белок -жир -зола, в том числе хлорид натрия	 58,2 17,2 22,0 2,3 1,7	 58,0 17,4 21,1 2,6 1,7
pH ВУС, % ПНС, Па	6,6 91,4 35	6,4 90,6 29
II. Окислительно-гидролитические изменения липидов -пероксидное число, г йода/100 г жира -кислотное число, мг КОН/г	 0,028 0,84	 0,021 0,79

Результаты исследований показали, что замена 2 % мясного сырья (свиной щековины) гидратированным мицелием гриба *T. versicolor* не приводит к существенным изменениям общего химического состава, величины pH и уровня водоудерживающей способности. Полученные данные

свидетельствуют о том, что введение препарата мицелия *T. versicolor* В 08/06 в мясные системы не только не интенсифицирует процессы окисления и гидролиза, но и, даже при малых концентрациях, обеспечивает ингибирование этих процессов, что можно объяснить содержанием в биомассе гриба антиоксидантов, таких как и флаваноиды, а также относительно высоким содержанием жира (21-22 %) в готовой продукции.

Следует отметить, что при введении мицелия имеют место положительные изменения и в состоянии структуры и органолептики: готовый продукт опытной партии характеризовался более нежной консистенцией (данные инструментальных исследований согласуются с результатами сенсорной оценки); в процессе дегустации члены комиссии отметили также наличие у опытных образцов продукции более насыщенной окраски, свежего запаха и усиленного вкуса, что может быть обусловлено высокой жироудерживающей и эмульгирующей способностями, пониженными значениями pH и содержанием глутаминовой кислоты (ПРИЛОЖЕНИЕ 8).

Результаты микробиологических исследований готовой продукции показали их соответствие требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 (таблица 17).

Таблица 17 - Микробиологические показатели ливерной колбасы (контрольной и опытной партий)

Показатель	КМАФАнМ,КОЕ/г ($2*10^3$)	БГКП, (не допускаются в 1,0 г продукта)	*St. aureus* (не допускаются в 1,0 г продукта)	Патогенные, в т.ч сальмонеллы и листерии (не допускаются в 25г продукта)	Сульфидредуцирующие клостридии (не допускаются в 0,01г продукта)
Образец из контрольной партии					
После производства	$2*10^3$	Не обнаружены			
На 5 сутки	$5*10^3$	Обнаружены	Не обнаружены		
Образец из опытной партии					
После производства	$1,8*10^3$	Не обнаружены			
На 5 сутки	$4*10^3$	Не обнаружены			

Более низкий уровень числа КАМАФАнМ в опытных образцах может быть обусловлен пониженными значениями pH у ливерных колбас, содержащих мицелий.

Учитывая стабилизирующее действие мицелия на окислительные и гидролитические процессы липидов, а также наличие у препарата антимикробного действия можно предполагать, что применение гриба *T. versicolor* в качестве компонента рецептур мясопродуктов создаст предпосылки для удлинения продолжительности хранения готовой продукции.

7.2 Получение натурального полимерного покрытия с противомикробными компонентами

В проблеме безопасности и сохранения пищевой ценности продуктов в цепи производство — реализация большое значение имеют защитные системы, в том числе упаковка, которая защищает пищевой продукт от механических, климатических, санитарно-гигиенических и других влияний внешней среды. Современные традиционные упаковочные материалы обеспечивают определенный уровень защиты, но не могут оказывать направленного воздействия на биохимические и микробиологические процессы, происходящие в пище. Поэтому в последнее время все большее внимание уделяется “активной” упаковке, обладающей функциональными свойствами и позволяющей получать пищевые продукты с лучшими сенсорными функциями и продлевать срок хранения, что обеспечивает качество и безопасность продуктов.

Активные полимерные материалы получают путем введения модификаторов (активных добавок) на стадии синтеза традиционно используемых полимеров или в композиции на стадии переработки их в изделия. Однако, использование природных полимеров представляется более перспективными в связи с их высокой активностью и доступностью, легкой утилизацией и нетоксичностью. Пищевые пленки на основе полисахаридов –

водорастворимых производных целлюлоз, защищают продукт от потерь массы (за счет снижения скорости испарения влаги) и создают определенный барьер проникновения кислорода и других веществ извне, замедляя процессы, вызывающие порчу продукта [64, 109].

Полимерный материал, используемый для получения пищевой пленки - модификация природного полимера целлюлозы – метилцеллюлоза: порошкообразный или волокнистый продукт белого или слегка желтоватого цвета, не имеющий вкуса и запаха. Марка МЦ-100 водорастворимая, полученная по ТУ 2231-107-057427-55-96, свойства которой (в твердой форме) представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Характеристики твердой водорастворимой метилцеллюлозы

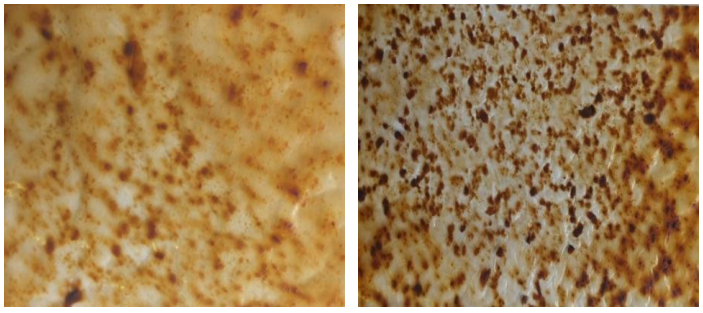
Наименование показателя	Значения
Содержание, % метоксильных групп золы, не более мышьяка влаги, не более pH 1 %-ного водного раствора	 26-33 0,3 - 6,0 <7
Вязкость 1 %-ного раствора при 20 ^{o}C, спз	51-80
Растворимость в воде, % не менее	98
Кажущаяся плотность, кг/м^3	289-499
Плотность, г/см^3	1,29-1,31
Температура, ^{o}C плавления обугливания	 290-305 300-305
Водопоглощение при 25 ^{o}C, % при 50 %-ной относительной влажности при 75 %-ной относительной влажности при 100 %-ной относительной влажности	 3-5 11 40-50

На первом этапе исследования получали полимерные пленки метилцеллюлозы, содержащие в качестве компонента мицелий штамма В 08/06 *Trametes versicolor*. Для чего в водные растворы метилцеллюлозы различной концентрации вводили мицелий гриба различной формы (таблица 19).

Таблица 19 – Состав полимерных пленок на основе метилцеллюлозы и мицелия гриба *Trametes versicolor*

№ образца	Содержание метилцеллюлозы, %	Вид препарата/содержание, %
1	2	сухой мицелий/0,5
2	1	сухой мицелий/0,5
3	2	сухой мицелий/1
4	1	сухой мицелий/1
5	2	культуральная жидкость/25
6	1	культуральная жидкость/25
7	2	культуральная жидкость/50
8	1	культуральная жидкость/50

Для получения пленки на основе метилцеллюлозы с добавлением сухого препарата штамма В 08/06 *Trametes versicolor* в водные растворы метилцеллюлозы различной концентрации добавляли, высушенный до постоянной массы и однородно измельченный, мицелий данного штамма, после чего полученные растворы дробно стерилизовали и отливали для получения пленки в стерильных условиях. Полученные пленки представлены на рисунке 29.



А Б

Рисунок 29 – Пленки метилцеллюлозы с добавлением сухого препарата мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor*:

А – пленка из 2 %-ного раствора метилцеллюлозы с добавлением 1 % препарата мицелия; Б – пленка из 1 %-ного раствора метилцеллюлозы с добавлением 1 % препарата мицелия

В результате исследований было установлено, что увеличение концентрации препарата мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor* влияет на внешний вид пленки: при повышении концентрации введенного мицелия происходит изменение цвета от светло-коричневого до темно-коричневого. Выявлено, что измельченный препарат мицелия расходится по раствору не полностью и участками видны просветы метилцеллюлозы. Показано, что во всех вариантах введения мицелия поверхность пленки ровная, из чего можно предположить, что весь препарат распределяется в толще раствора и не создает шероховатостей поверхности пленки.

Для получения пленки на основе метилцеллюлозы с добавлением культуральной жидкости штамма В 08/06 *Trametes versicolor* метилцеллюлозу различной концентрации разводили культуральной жидкостью, после чего доводили дистиллированной водой до нужного объема, затем дробно стерилизовали и асептически отливали пленки. Полученные пленки представлены на рисунке 30.

А Б

Рисунок 30 – Пленки метилцеллюлозы с добавлением культуральной жидкости штамма В 08/06 *Trametes versicolor*:

А – пленка из 2 %-ного раствора метилцеллюлозы с добавлением 25 % культуральной жидкости; Б – пленка из 1 %-ного раствора метилцеллюлозы с добавлением 50 % культуральной жидкости

Отмечено, что культуральная жидкость равномерно распределяется в полимерном материале, однако можно наблюдать единичные вкрапления мицелия. Поверхность пленок гладкая с незначительными отблесками. С увеличением концентрации культуральной жидкости цвет пленки становится

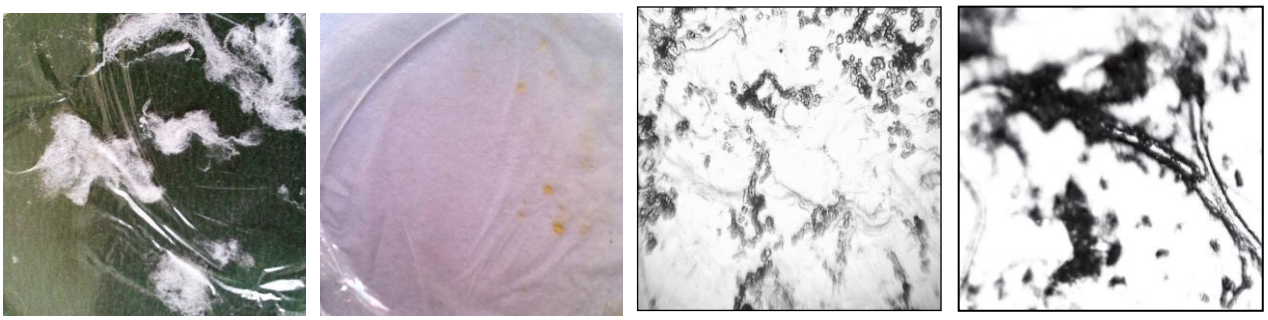
более насыщенным, а с увеличением концентрации метилцеллюлозы увеличивается плотность пленки.

Были получены пленки путем культивирования жизнеспособного мицелия в растворе метилцеллюлозы различной концентрации (таблица 20).

Таблица 20 – Состав полимерных пленок на основе метилцеллюлозы и жизнеспособного мицелия гриба *Trametes versicolor* В 08/06

№ образца	Содержание метилцеллюлозы, %	Метод культивирования
1	1	Стационарное
2	1	Погруженное
3	2	Стационарное
4	2	Погруженное
5	3	Стационарное
6	3	Погруженное
7	4	Стационарное
8	4	Погруженное
9	5	Стационарное
10	5	Погруженное

Для получения пленки с жизнеспособным мицелием инокулят штамма В 08/06 *T. versicolor* культивировали в растворе метилцеллюлозы различной концентрации в течение. Культивирование проводили стационарно и при постоянном перемешивании в режиме 100 об./мин. Полученную биомассу мицелия в растворе метилцеллюлозы отливали пленки в асептических условиях. Полученные пленки представлены на рисунке 31.



А Б В Г

Рисунок 31 – Пленки из 2 %-ного раствора метилцеллюлозы с жизнеспособным мицелием штамма В 08/06 *Trametes versicolor*:

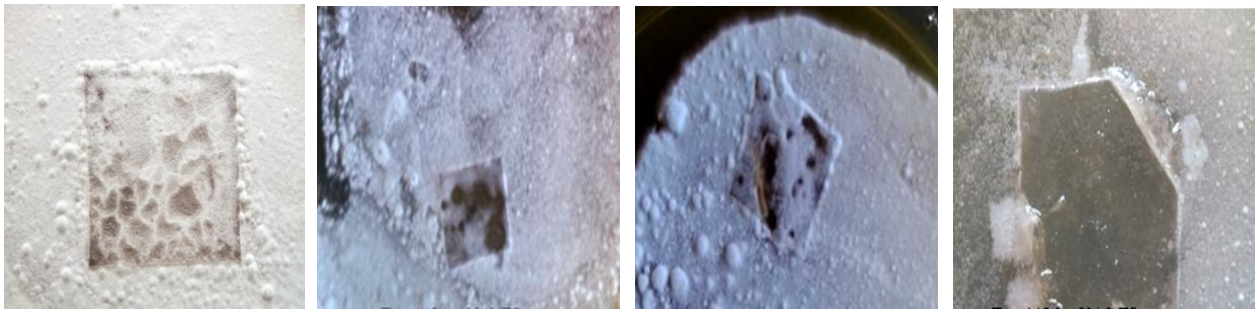
А – пленка полученная при стационарном культивировании; Б – пленка полученная при глубинном культивировании; В - микроскопия мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor* в пленке, полученной при стационарном культивировании; Г - микроскопия мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor* в пленке, полученной при погруженном культивировании

Установлено, что при стационарном культивировании штамма В 08/06 *Trametes versicolor* в водных растворах метилцеллюлозы различной концентрации жизнеспособный мицелий располагается в субстрате в виде клочкообразных «островков» мицелия белого цвета, а при погруженном культивировании на качалке базидиомицет равномерно растет в форме мелких пеллет в толще среды, которые при отливе пленки образуют единичные вкрапления.

Также было отмечено, что в процессе стационарного культивирования разжижение водного раствора метилцеллюлозы происходит только вокруг мицелия, который продуцирует целлюлолитические ферменты, за счет чего раствор становится не однородным, в то время как при погруженном культивировании с перемешиванием на термостатируемом шейкере происходит равномерное распределение мицелия в субстрате, и полимер получается гомогенным.

При кльтивировании мицелия *T. versicolor* В08/06 происходит разжижение 1%-го раствора метилцеллюлозы, поэтому получить пленку из данного раствора не представляется возможным. Для дальшнейших исследований использовали пленку, полученную путем биоконверсии *Trametes versicolor* 2, 3, 4 и 5%-ных растворов метилцеллюлозы.

Для исследования противоплесневой активности пленок, полученных в соответствии условиями, указанными в таблицах 19 и 20, использовали штаммы грибов рода *Penicillium,* вызывающих плесневение пищевых продуктов. В качестве контрольного образца была использована пленка, полученная из 2%-ного раствора метилцеллюлозы без добавок. Учет результатов проводили путем визуальной оценки роста колоний микроорганизмов в зоне исследуемых образцов пленок (рисунок 32).



А Б В Г

Рисунок 32 – Колонизация пленок на основе метилцеллюлозы (МЦ) с добавлением различного вида мицелия штамма В08/06 *Trametes versicolor*:

А – контроль МЦ без добавления мицелия на штамме *F-4484*; Б – 2 %-ная МЦ с добавлением компонента сухого порошка мицелия на штамме *F-4484;* В – 2 % ная МЦ с добавлением 25 % культурального фильтрата базидиовицета на штамме *F-4486;* Г – 5 %-ная МЦ с жизнеспособным мицелием, полученная путем биоконверсии *F-4486*

Согласно визуальной оценке можно сделать вывод о том, что пленки, полученные из растворов метилцеллюлозы различной концентрации с добавкой сухого препарата мицелия или культуральной жидкости штамма В 08/06 *Trametes versicolor*, не проявили противоплесневой активности. Все образцы данных пленок были полностью поражены микроскопическими грибами рода *Penicillium.*

Проведенные эксперименты в отношении пленок метилцеллюлозы с культивированием жизнеспособного мицелия штамма *T. versicolor* показали, что данные пленки проявляют противоплесневую устойчивость. Так пленка 2, 3 и 4%-ной метилцеллюлозы с жизнеспособным мицелием не дает развиться штаммам: *P. brevicompactum*, *P. commune*, *P. nalgiovense* и замедляет развитие штаммов*: P. roqueforti* и *P. polonicum* по сравнению с контролем.

Однако, наибольшая активность отмечена у пленок, полученных из раствора 5 %-ной метилцеллюлозы после культивирования мицелия штамма В 08/06 *T. versicolor*. Эти пленки были устойчивы к колонизации всеми штаммами микроскопических грибов рода *Penicillium,* за исключением вариантов оценки инфицирования штаммом *P. polonicum*. Однако, процесс колонизации пленки этим возбудителем плесневения был значительно медленнее, чем в контрольных вариантах.

Антимикробную активность проводили для пленки, полученной из метилцеллюлозы с добавлением различных компонентов: сухого мицелия и культуральной жидкости штамма В 08/06 *Trametes versicolor*, а также пленки, полученные биоконверсией раствором метилцеллюлозы различной концентрации. Контролем служила пленка полученная из водного раствора 2%-ной метилцеллюлозы. Исследования проводили на тест-культурах условно-патогенных микроорганизмов, выбор которых связан с требованием биологической безопасности продуктов питания. Учет результатов проводили путем визуальной оценки роста колоний микроорганизмов в зоне исследуемых образцов пленок (рисунок 33).

А Б В Г

Рисунок 33 – Антимикробная активность пленок на основе метилцеллюлозы (МЦ) с добавлением различного вида мицелия штамма В 08/06 *Trametes versicolor:*

А – 2 %-ная МЦ с добавлением 25 % культурального фильтрата базидиовицета на *B. subtilis*; Б – 5 %-ная МЦ с жизнеспособным мицелием, полученная путем биоконверсии на *B. coagulans*; В - 2 %-ная МЦ с жизнеспособным мицелием, полученная путем биоконверсии на L. monocytogenes; Г – контроль МЦ без добавления мицелия *C. albicans*

Согласно визуальной оценке можно утверждать, что пленки, полученные из растворов метилцеллюлозы различной концентрации с добавкой сухого препарата мицелия или культуральной жидкости штамма В 08/06 *Trametes versicolor* не устойчивы к колонизации всеми исследуемыми штаммами.

Пленки, полученные путем культивирования продуцента *T. versicolor* на растворах метилцеллюлозы различной концентрации, не колонизируются грамположительными бактериями: *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* и *L. monocytogenes* и грамположительной бактерией *E. coli* и дрожжеподобным грибом *C. albicans.*

Таким образом, установлено, что противоплесневую и антимикробную активность проявляют только пленки, полученные из растворов метилцеллюлозы различной концентрации при культивировании жизнеспособного мицелия. Из вышеуказанных фактов можно предположить, что в процессе получения растворов с препаратом сухого мицелия и культуральной жидкостью соединения, имеющие противоплесневую и антимикробную активность, инактивируются при стерилизации пленок.

Полученные положительные результаты послужили основанием для проведения исследований по определению реологичских свойств растворов и физико-механических свойств пленок. В ходе исследования было установлено, что наличие «жизнеспособного» мицелия штамма В 08/06 *T. versicolor* влияет на вязкость раствора метилцеллюлозы.

Для исследования была использованы растворы метилцеллюлозы концентраций от 3 до 5%-ной, подходящей по консистенции для использования их в качестве питательного субстрата для культивирования штамма В 08/06 *T. versicolor*. В ходе проведения эксперимента было установлено, что штамм В 08/06 *T. versicolor* в 200 раз снижает вязкость раствора метилцеллюлозы, в сравнении с контролем. Таким образом, для получения пленки, обладающей антимикробными характеристиками, следует культивировать штамм *T. versicolor* в 5%-м водном растворе метилцеллюлозы. При этом его абсолютная вязкость достигает величины, близкой к вязкости 2%-

ного раствора чистой метилцеллюлозы, из чего следует, что при культивировании продуцента концентрация метилцеллюлозы становится близкой к 2%-ной, при этом в массе культуральной жидкости накапливаются противомикробные соединения и ферменты.

В результате исследований на разрушающее напряжение и относительное удлинение, проводимых на разрывной машине «РМ-50», показано, что культивирование мицелия штамма в растворе метилцеллюлозы, влияет на физико-механические показатели пленки: уменьшается разрушающее напряжение и относительное удлинение при разрыве, которые можно приблизить к показателям пленки, полученной из 2%-ного раствора метилцеллюлозы, при повышении концентрации метилцеллюлозы до 5% (ПРИЛОЖЕНИЕ 9).

Полученные после культивирования штамма на 5%-ном растворе метилцеллюлозы фильтраты использовали для покрытия продуктов. Для чего использовали сухофрукты курагу и колбасу.

Установлено, что в течение 14 суток убыль массы у продуктов обработанных покрытием, содержащим метилцеллюлозу и мицелий гриба *Trametes versicolor* как компонент ниже, чем у продуктов в контроле без покрытия, что положительно сказывается на внешнем виде продукции, а также на экономических показателях.

Микробиологические показатели смывов с поверхности исследуемых продуктов, по истечении 3 месяцев, как контрольных, так и опытных образцов, полностью соответствуют СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов"(ПРИЛОЖЕНИЕ 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В пищевом производстве всегда актуальна проблема свежести и качества продуктов. Одним из ведущих негативных факторов, оказывающих влияние на данные показатели, являются микроорганизмы: бактерии, грибы, актиномицеты. Для сохранения пищевых продуктов в барьерных технологиях используют физические (замораживание, стерилизация, обработка ультразвуком, облучение ультрафиолетовыми лучами), биохимические (молочная кислота и этилового спирта, полученные путем брожения) и химические методы защиты пищевых продуктов. К химическим методам в основном относят использование в процессе производств пищевых добавок с антисептическим эффектом и антибиотиков.

Однако, безопасность пищевых продуктов и ингредиентов, используемых при производстве, также не отходит на задний план. В большинстве случаев добавки, используемые для сохранения качества пищевых продуктов, имеют химическую природу, а, следовательно, должны строго соблюдаться все нормативы по их применению, что не всегда выполняется недобросовестными производителями. Нарушение регламентов может вызывать у потребителя серьезные заболевания и нарушение функционирования организма. Поэтому становится актуальной проблема получения пищевых добавок с противомикробными свойствами на основе базидиальных грибов, таких как *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor.*

Для объективной оценки возможности использования исследуемых штаммов в качестве пищевых добавок важным аспектом является исследования биохимического состава мицелия штаммов, токсичности и проявление противомикробных свойств.

Согласно полученным данным, в биомассе мицелия общее содержание белка у штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* составило 20,9 26,2 и 17,8 %, соответственно. Аминокислотный анализ белка показал наличие незаменимых аминокислот, среди которых преобладают лейцин и треонин, для

штаммов *F. officinalis* и *F. pinicola* 24,5 и 22,9 %, соответственно, от общего количества аминокислот, а у штмма *T. versicolor* – 31,8 %, что позволяет оценивать мицелий как ценный пищевой компонент. Наличие в мицелии полисахаридов, в том числе и глюканов, также характеризует мицелий как возможный источник получения биологически активных веществ, которые по данным многих авторов обуславливают антиканцерогенное, противовирусное, иммуностимулирующее действие. В мицелии исследуемых штаммов количество полисахаридов составляет от 24,1 до 57,1%. Наибольшее количество трудногидролизуемых полисахаридов определено у штамма *T. versicolor* – 42,8%, для штаммов *F. officinalis* и *F. pinicola* - 16,4 и 28,3%, соответственно. Общее количество глюканов для штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* составляет 9,9, 27,7 и 41,2 %, соответственно. Кроме того, исследования токсичности на инфузориях показало отсутствие негативного влияния на тест-организмы *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis* для всех исследуемых штаммов.

Кроме биохимического состава и токсичности, важным показателем, в отношении целесообразности отбора штаммов продуцентов, является скорость роста на различных субстратах, накопление биомассы и возможность стимуляции ростовых показателей для улучшения экономической эффективности. Так, наилучшими субстратами являются: мальтакс с добавлением опилок, овсяный агар, пшено, опилки с добавлением ржаных отрубей.

Показана возможность использования воздействия когерентного и некогерентного света. Так, при жидкофазном стационарном культивировании выход биомассы для штамма *F. officinalis* увеличивается на 7% по сравнению с контролем, *F. pinicola* – на 8,5%, а для *T. versicolor* – на 11% под воздействием когерентного света, но на ростовые показатели штаммов *F. officinalis и F. pinicola* при твердофазном культивировании, также как и звуковые волны не оказывают достоверного эффекта, в то время как у штамма *Trametes versicolor*

В 08/06 ростовой коэффициент увеличивается почти в 3 раза, за счет образования более высокого и плотного мицелия.

Показана противомикробная активность (на микроорганизмах, вызывающих порчу пищевых продуктов) для всех исследуемых штаммов, однако, наилучшие показатели были выявлены у штамма *T. versicolor* В 08/06, поэтому дальнейшие исследования проводились только с этим штаммом.

Наряду с проведенными исследованиями была показана возможность использования «живого» мицелия штамма *Trametes versicolor* В 08/06 в качестве противомикробной добавки при получении «активной» упаковки. Также была показана возможность использования сухого измельченного мицелия штамма *T. versicolor* В 08/06 в качестве добавки при получении колбасных продуктов, например, для замены искусственных пищевых добавок.

Предложена технологическая схема получения мицелия штамма *Trametes versicolor* В 08/06 для использования его в качестве источника противомикробного препарата для пищевых продуктов (рисунок 34).

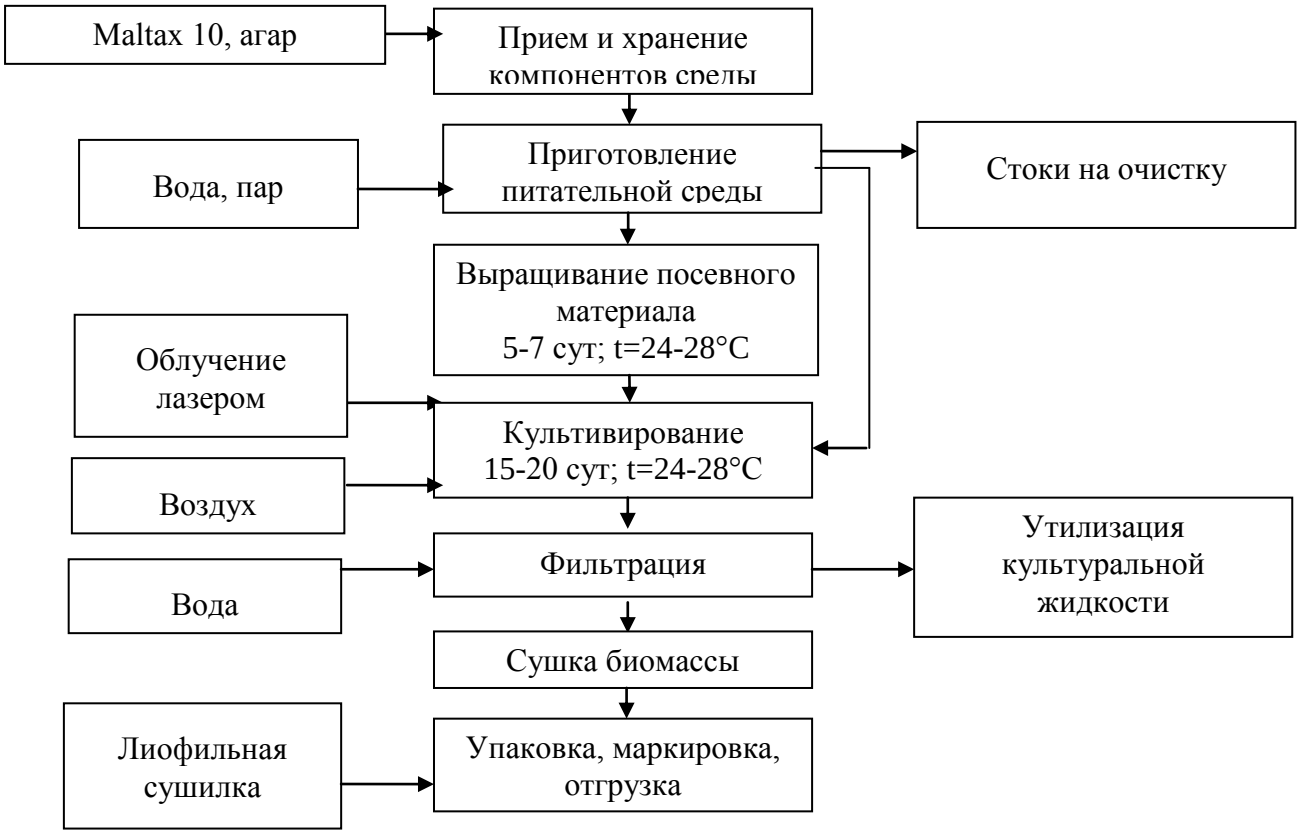


Рисунок 34 – Принципиальная технологическая схема процесса получения биомассы мицелия штамма *Trametes versicolor*

ВЫВОДЫ

1. В результате исследований установлено, что штаммы базидиомицетов из родов *Fomitopsis* и *Trametes* обладают широким спектром противомикробной активности в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и микромицетов рода *Penicillium* – опасных контаминантов пищевых продуктов. Антагонистические свойства штаммов базидиомицетов в отношении возбудителей плесневения обусловлены наличием у исследуемых штаммов хитиназной и целлюлазной активности.

Штаммы, обладающие максимальной противомикробной активностью, идентифицированы на основании культурально-морфологических, физиологических и молекулярно-генетических свойств как: *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06 .

2. При твердофазном и жидкофазном культивировании когерентный и некогерентный свет оказывает позитивный стимулирующий эффект на ростовые показатели роста мицелия штамма *T. versicolor* B08/06. Максимальный эффект отмечен при трехкратном облучении когерентным светом экспозиционной дозой в 1,8 Дж, что может быть использовано для стимулирования роста штамма при производстве мицелия.

3. Установлено, что мицелий штаммов базидиомицетов содержит биологически ценный белок в количестве 20,9 % у *F. officinalis*; 26,2 % у *F. pinicola* и 17,8 % у *T. versicolor*, в составе которого преобладают незаменимые аминокислоты - лейцин, треонин и лизин. На установке «искусственный желудок» доказано, что перевариваемость мицелия штаммов составляет для *F. officinalis* – 23,7 мг, *F. pinicola* – 17,6 мг и *T. versicolor* – 15,9 мг тирозина/г белка и сопоставима с эталонным белком.

4. Биомасса мицелия штаммов *Fomitopsis officinalis, Fomitopsis pinicola* и *Trametes versicolor* не является токсичной в отношении инфузорий *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*. Способность штаммов *F. officinalis, F. pinicola* и *T. versicolor* утилизировать широкий набор субстратов,

технологичность и низкая токсичность в отношении простейших позволяет рекомендовать их для разработки кормовых добавок.

5. В результате испытаний показано, что мицелий штамма *T. versicolor* B08/06 целесообразно рекомендовать для разработки пищевой добавки в технологиях ливерных колбас и других мясопродуктов.

6. Установлено, что при проведении процесса биоконверсии метилцеллюлозы штаммом *T. versicolor* B 08/06 получено полимерное покрытие, обладающее противомикробными свойствами, обусловленными наличием жизнеспособного мицелия в пленке, и которое можно рекомендовать в качестве «активного» компонента для защиты пищевых продуктов от поражения опасными биологическими контаминантами. Использование сухого мицелия штамма как компонента противомикробных соединений в полимерных покрытиях на основе метилцеллюлозы нецелесообразно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автономова, А.В. Оптимизация питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. / А.В. Автономова, Л.М. Краснопольская, В.Н. Максимов // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 2. – С. 186-192.

2. Айрапетова, А.Ю. Выделение и идентификация агарициновой кислоты из мицелия *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing. / А.Ю. Айрапетова, Т.И. Громовых // Химия растительного сырья. – 2013. - № 2. – С. 101-106.

3. Акопян, Б.В. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами / В.Б. Акопян, Ю.А. Ершов. - М.: Изд-во МГТУ им. Баумана, 2005. - 222 с.

4. Бабицкая, В.Г. Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *G. lucidum* на образование полисахаридов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова и др. // Биотехнология. - 2007. - № 6. — С. 34-41.

5. Бабицкая, В.Г. Природные меланиновые пигменты некоторых микро- и макромицетов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 3. – С. 286-291.

6. Бабицкая, В.Г. *Phallus impudicus* (L.: PERS.), *Hericium erinaceus* (BULL.: FR.) PERS. и *Trametes versicolor* (FR.) QUEL. перспективные объекты биотехнологии / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.В. Филимонова и др. // Успехи медицинской микологии. - 2006. - Т. 7. - С. 220-222.

7. Бейли, М.Р. Физические механизмы воздействия терапевтического ультразвука на биологическую ткань / М.Р. Бейли, В.А. Хохлова и др. // Акустический журнал. - 2003. - Т. 49, № 4. – 447 с.

8. Белова, Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России / Белова Н.В. // Микология и фитопоталогия. - 2004. - Т. 38, № 2. - С. 1-7.

9. Белова, Н.В. Природа биологической активности высших грибов / Н.В. Белова // Успехи медицинской микологии. - 2001. - Т. 1. - С. 230-233.

10. Бондарцев, А.С. Трутовые грибы европейской части России и Кавказа /А.С. Бондарцев. - М.-Л.: Изд-во АН:СССР, 1953. – 1107 с.

11. Бондарцева, М.А. Определитель грибов России. Афиллофоровые грибы / М.А. Бондарцева. - Л.: Наука, 1998. – 391 с.

12. Ботаника. Курс альгологии и микологии / под ред. Ю.Т. Дьякова. - М.: МГУ, 2007. – 557 с.

13. Бурмистрова, А.Л. Антибиотики и антибиотикорезистентность. Проблемы и пути решения / А.Л. Бурмистрова, Л.И. Бахарева, Н.Э. Шафикова. — Челябинск: Челябинский Дом печати, 2002. - 178 с.

14. Бурова, Л.Г. Загадочный мир грибов / Л.Г. Бурова. - М.: Наука, 1991. – С. 22-24.

15. Бухало, А.С. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в 2-х т. / А.С. Бухало, В.Г. Бабицкая, Н.А. Бисько и др. - Киев: Альтпресс, 2011. - Т. 1. – 212 с.

16. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. - Киев: Наукова думка, 1988. - 144 с.

17. Ващук, Л.Н. Леса и лесное хозяйство Иркутской области / Л.Н. Ващук, Л.В. Попов, В.В. Телятьев. - Иркутск: Сибирь, 1997. - 288 с.

18. Волчатова, И.В. Использование грибов для удаления древесных остатков в условиях урбанизированных экосистем / И.В. Волчатова, С.А. Медведева // Успехи медицинской микологии. - 2006. - Т. 7. - С. 234-235.

19. Гаврилин, М.В. Идентификация агарициновой кислоты методом инфракрасной спектроскопии / М.В. Гаврилин, В.Г. Беликов, А.Ю. Айрапетова, П.А. Цуканова // Вестник ВГУ. — 2006. - № 2. - С. 231-232.

20. Гарибова, Л.В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. - М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. - 220 с.

21. Гвоздкова, Т.С. Оценка возможности использования базидиальных грибов в качестве источников биоактивных липидных компонентов / Т.С. Гвоздкова, Т.В. Черноок, Т.В. Филимонова и др. // Успехи медицинской микологии. - 2007. - Т. 9. - С. 151-154.

22. Голубев, В.Н. Пищевые и биологически активные добавки / В.Н. Голубев, Л.В. Чичева-Филатова, Т.В. Шленская — М.: Издательский центр «Академия», 2003. - 208 с.

23. Горнова, И.Б. Использование видимого света в биотехнологии / И.Б. Горнова // Современная микология в России. Первый съезд микологов. - 2002. – С. 294-295.

24. Горшина, Е.С. «Трамелан» – отечественная биологически активная добавка на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat и другие препараты грибов рода *Trametes* / Е.С. Горшина // Успехи медицинской микологии. – 2005. - Т. 5. – С. 262-266.

25. Горшина, Е.С. Биотехнологический препарат лекарственного гриба кориола опушенного / Е.С. Горшина, М.М. Скворцова, В.Г. Высоцкий // Современная микология России. Первый съезд микологов России. - 2002. – С. 295.

26. Горшина, Е.С. Биотехнологический способ производства лекарственного гриба кориола опушенного / Е.С. Горшина, М.М. Скворцова, В.Г. Высоцкий // Современная микология России. Первый съезд микологов России. - 2002. – С. 253.

27. Горшина, Е.С. Грибы рода *Trametes* Fr. как объекты биотехнологии / Е.С. Горшина // Успехи медицинской микологии. - 2009. - Т. 9. - С. 328-329.

28. Горшина, Е.С. Морфологические и физиолого-биохимические особенности грибов рода *Coriolus* Quel., продуцентов биологически активных веществ / Е.С. Горшина // Современная микология России. Первый съезд микологов России. - 2002. – С. 253-254.

29. ГОСТ 9.049-91 Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. Введ. 01.07.92. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 1992. – 15 с.

30. ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. Введ. 01.01.90. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 8 с.

31. ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Введ. 01.01.96. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 7 с.

32. ГОСТ 14236-81 Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. Введ. 01.07.81. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 1989. – 11 с.

33. ГОСТ 18249-72 Пластмассы. Метод определения вязкости разбавленных растворов полимеров. Введ. 01.01.74. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2000. – 7 с.

34. ГОСТ 23042-86 Мясо и мясные продуты. Методы определения жира. Введ. 01.01.88. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2003. – 5 с.

35. ГОСТ 25011-81 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка. Введ. 01.01.83. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 7 с.

36. ГОСТ 29185-91 Продукты пищевые. Методы выявления и определенияя количества сульфитредуцирующих клостридий. Введ. 01.01.93. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 7 с.

37. ГОСТ 9957-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины и говядины. Метод определения хлористого натрия. Введ. 01.07.74. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2001. – 4 с.

38. ГОСТ 9959-91 Продукты мясные. Общие условия проведения органолептической оценки. Введ. 01.01.93. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2003. – 9 с.

39. ГОСТ Р 50457-92 Жиры и масла животные и растительные. Определение кислотного числа и кислотности. Введ. 01.01.94. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2006. – 8 с.

40. ГОСТ Р 50814-95. Мясопродукты. Методы определения пенетрации конусом и игольчатым интентором. Введ. 01.08.96. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2003. – 8 с.

41. ГОСТ Р 51448-99. Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований. Введ. 01.01.01. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 8 с.

42. ГОСТ Р 51487-99 Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа. Введ. 01.01.01. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2008. – 8 с.

43. ГОСТ Р 51921-2002 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*. Введ. 01.07.03. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 22 с.

44. ГОСТ Р 52814-2007 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. Введ. 01.01.09. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 20 с.

45. ГОСТ Р 52815-2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. Введ. 01.01.09. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 25 с.

46. ГОСТ Р 52816-2007. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек. Введ. 01.01.09. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 18 с.

47. ГОСТ Р 53642-2009 Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы. Введ. 01.01.10. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2010. – 12 с.

48. ГОСТ Р 54646-2011. Колбасы ливерные. Технические условия. Введ. 01.01.13. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2013. - 20 с.

49. Громовых, Т.И. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета Tyv-2006 *Fomitopsis officinalis* (Wiil.) Bondartsev et Singer / Т.И. Громовых, Г.К. Ковалева // Вестник красноярского государственного университета. 2009. - № 1. – С. 68-75.

50. Громовых, Т.И. Исследование токсических свойств штамма LS 1-06 *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill и оценка перспектив его использования / Т.И. Громовых, И.Е. Иванова, А.В. Шнырева и др. // Проблемы медицинской микологии. – Т. 15, № 4. – С. 63-69.

51. Данильчук, Т.Н. Влияние низкоинтенсивной акустической обработки на свойства препарата «Пепсин говяжий» / Т.Н. Данильчук, В.А. Шепелев // Сыроделие и маслоделие. - 2011. - № 6. – С. 37-39.

52. Данильчук, Т.Н. Стимуляция биохимических процессов в прорастающем зерне акустическими и электрофизическими методами воздействия / Т.Н. Данильчук, Д.Н. Юрьев, А.Ю. Ратников // Пиво и напитки. - 2008. - № 6. - С. 11-14.

53. Данько, С.Ф. Звуковая обработка ячменя на различных стадиях солодоращения / С.Ф. Данько, Т.Н. Данильчук, Д.Н. Юрьев, В.В. Егоров // Пиво и напитки. - 2000. - № 5. – С. 50-51.

54. Данько, С.Ф. Проращивание ячменя после воздействия звуком разной частоты / С.Ф. Данько, Т.Н. Данильчук, Д.Н. Юрьев, В.В. Егоров // Пиво и напитки. - 2000. - № 3. - С. 22-23.

55. Денисова, Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк / Н.П. Денисова. - Спб: СПГМУ, 1998. - 60 с.

56. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. - М.: Наука, 2004. - 528 с.

57. Ефименко, О.М. О химическом составе плодового тела и искусственных культур трутового гриба *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond. et Sing. / О.М. Ефименко, Л.В. Агеенкова // Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства. – М.-Л.: Наука, 1965. – С. 92-97.

58. Жаринов А.И. Использование мицелия вешенки при производстве мясопродуктов / А.И. Жаринов, Т.И. Громовых Д.М. Соц, Е.А. Беляев // Мясная индустрия. – 2012. - № 3. – С. 45-46.

59. Забалуева, Ю.Ю. Методы исследований мяса и мясных продуктов / Ю.Ю. Забалуева, С.Н. Павлова, С.Ю. Лескова. - Улан-Удэ: ВСГТУ, 2005. - 78 с.

60. Ковалева, Г.К. Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat.: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.24 // Ковалева Гульмира Кажгалиевна. - М., 2009. - 21 с.

61. Копытько, Я.Ф. Аминокислоты и жирные кислоты настоек парнасия (белозора болотного) гомеопатических матричных / Я.Ф. Копытько // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. - Т. 37, № 7. – С. 11-14.

62. Костина, Н.Е. Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н.Е. Костина, Ж.Б. Ибрагимова, М.А. Проценко и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - № 2. – С. 25-26.

63. Краснопольская, Л.М. Высокоэффективные способы погруженного культивирования ксилотрофных лекарственно – съедобных видов базидиальных грибов / Л.М. Краснопольская, А.В. Автономова, М.И. Леонтьева и др. // Успехи медицинской микологии. - 2007. - Т. 9. – С. 243-245.

64. Кузнецова, Л.С. Съедобные упаковочные пленки и покрытия / Л.С. Кузнецова, Г.Х. Кудрякова, М.Н. Нагула и др. // Продукты и прибыль. - 2007. - № 7. – С. 32-35.

65. Кузнецова, Л.С. Защита сырокопченых колбас от плесени / Л.С. Кузнецова, Н.В. Михеева, Н.В. Кузнецова, Г.П. Чижов // Мясная индустрия. - 2009. - № 5. – С. 38-41.

66. Кузнецова, Л.С. Научное обоснование и практические основы защиты поверхности пищевых продуктов от поражения мицелиальными грибами: дис…док. техн. наук: 05.18.07 // Кузнецова Людмила Станиславовна. – М., 2003. – 435 с.

67. Кузнецова, Л.С. Состав плесневых грибов, поражающих поверхность мясной продукции / Л.С. Кузнецова, Н.В. Михеева, Е.В. Казакова и др. // Мясная индустрия. - 2009. - № 3. – С. 28 – 30.

68. Кьосьев, П.А. Полный справочник лекарственных растений / П.А. Кьосьев. - М., 2002. - 992 с.

69. Линовицкая, В.М. Влияние различных источников азота и углеродва на рост высших дереворазрушающих базидиальных грибов / В.М. Линовицкая, Л.П. Дзыгун, И.Р. Клечак, А.С. Бухало // Современная микология в России. Второй съезд микологов. – 2008. – С. 335.

70. Ломинина, Е.В. Изучение протеолитической активности высших базидиомицетов / Е.В. Ломинина // Фундаментальные науки и практика. - 2010. – Т. 1, № 1. – С. 131-132.

71. Методы общей бактериологии / под ред Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1983. – 536 с.

72. Михеева, Н.В. Механизм экспансии плесневых грибов на поверхности колбас / Н.В. Михеева, Л.С. Кузнецова // Мясная индустрия. - 2010. - № 4. – С. 23-26.

73. Нагула, М.Н. Состав мицелиальных грибов поражающих поверхность полутвердых сыров / М.Н. Нагула, Л.С. Кузнецова, С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина // Сыроделие и маслоделие. – 2009. – № 2. – С. 36-37.

74. Непокоичицкий, Г.А. Большая энциклопедия лекарственных растений / Г.А. Непокоичицкий, Г.В. Балакирев, И.А. Губанов, Е.М. Козина. - М.: АИС, 2006. - 960 с.

75. Низовская, О.П. К сравнительной физиологической характеристике грибов из порядка *Aphylophoralles* и *Agaricales* / О.П. Низовская, Н.М. Милова // Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства.- М.-Л.:Наука, 1965. - С. 6-11.

76. Огарков, Б.Н. Микро- и макромицеты как основа биотехнологических препаратов / Б.Н. Огарков, Т.Р. Огаркова, Л.В. Салусенок // Известия Иркутского государственного университета. - 2010. – Т. 3, № 2. – С. 75-86.

77. Озерова, Н.С. Экологические особенности ксилотрофных базидиомицетов родов *Laetiporus* Murill и *Ganoderma* P. Karst.: дис… канд.биол.наук: 03.00.24 // Озерова Надежда Семеновна. - М., 2006. – 121 с.

78. Ооржак, У.С. Белковые вещества и витамины гриба *Fomitopsis officinalis* [(Vill.: Fr.) Bond. et Sing] / У.С. Ооржак, В.М. Ушанова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2004. - № 11. – С. 52.

79. Ооржак, У.С. Научно-практические аспекты рационального использования плодовых тел *Fomitopsis officinalis* (Will.) Bond et Sing.: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.32/Ооржак Урана Спартаковна. – Красноярск, 2006. — 18 с.

80. Патент RU 2045918, МПК A23L1/31 Способ определения переваримости белков пищевых продуктов *in vitro* / С.Б. Юдина, Н.Н. Липатов; ГОУ ВПО Московский государственный университет прикладной биотехнологии (RU). - № 93020038/13; Заявл. (16.04.1993); Опубл. (20.10.1995).

81. Патент RU 2122025, МПК C12M1/34, C12M1/36, C12Q1/02, C12Q1/00, G01N35/02, G01N35/04, G01N33/00, G01N33/02, G01N33/48 Устройство для оценки качества продуктов живой и неживой природы / А.С. Иванов, Е.Г. Иванова. - № 97118211/13; Заявл. (31.10.1997); Опубл. (20.11.1998).

82. Патент RU 2241744, МПК C12N1/20, C12N9/42 Способ культивирования бактерий *Serratia marcescens,* продуцента хитиназы / А.Б. Дужак, З.И. Панфилова, Е.А. Васюнина; Институт цитологии и генетики СО РАН (RU). - № 2003103160/13; Заявл. (03.02.2003); Опубл. (10.12.2004).

83. Патент RU 2257222, МПК A61K35/84 Комплексная переработка гриба трутовик лекарственный (*Fomitopsis officinalis*(Vill.:Fr.) Bond. Et Sing.) / У.С. Ооржак, В.М. Ушанова, В.И. Канзай; ГОУ ВПО Сибирский государственный технологический университет (RU). – № 2004120448/15; Заявл. (02.07.2004); Опубл. (27.07.2005), Бюл. № 21.

84. Патент RU 2296160, МПК C12N9/62, C12N15/57, C12N15/63, C12N1/15, C12P21/00, C07K16/40, G01N33/573 Новые гены, кодирующие новые протеолитические ферменты / Э. Люппо (NL), В.Д. Альбертус Алард (NL), К. Филипп (DE) и др.; DSM I.P. Assats B.V. (NL). - Заявл. (22.02.2002); Опубл. (27.03.2007).

85. Патент RU 2323966, МПК (2006) C12N1/14, A61K36/06 Штамм гриба *Trametes pubescens* С-23 – продуцент эргостерина и препарат, положительно влияющий на тканевый обмен, стимулирующий иммуногенез и способствующий восстановлению нарушенной оксидаз-смешанной функции печени / Е.С. Горшина, А.Г. Скворцов; ООО «Микролек» (RU). - № 2005134036/13; Заявл. (07.11.2005); Опубл. (10.05.2008).

86. Патент RU 2330676, МПК (2006) A61K36/074, A61K31/20, B01D11/02 Способ получения агарициновой кислоты / А.Ю Айрапетова, П.А. Цуканова, М.В Гаврилин, Т.А. Шаталова; ГОУ ВПО

Пятигорская государственная фармацевтическая академия (RU). - № 2007100417/15; Заявл. (09.01.2007); Опубл. (10.08.2008), Бюл. № 22.

87. Патент RU 2360960, МПК (2006) C12N1/14, A61K35/74 Штамм базидиомицета *Fomitopsis Tyv-2006,* используемый для получения противоопухолевых препаратов / Т.И. Громовых, Г.К. Ковалева, Л.И. Черепанов и др.; ФГОУ ВПО Сибирский федеральный университет (RU). - № 2007147074/13; Заявл. (17.12.2007); Опубл. (10.07.2009).

88. Патент RU 2370279, МПК (2006) A61K38/48, A23J3/34, C07K1/12, A61P1/14 Применение пролинспецифичных эндопротеаз для гидролиза пептидов и белков / Э. Люппо (NL), В.Д.Х. Робертус (NL), А. Мийндерт (NL) и др.; DSM I.P. Assats B.V. (NL). - № 2006113586/15; Заявл. (23.09.2004); Опубл. (10.08.2006).

89. Патент RU 2375439, МПК (2006) C12N1/14, A61K36/06 Штамм базидиального гриба *Fomitopsis officinalis Tyv-2006,* проявляющий антибактериальную активность в отношении бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* / М.Л. Сидоренко, Л.С. Бузолева, Н.Ю. Ефремова, М.Е. Буллах; Биолого-почвенный институт ДО РАН (RU), ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (RU). - № 2008112962/13; Заявл. (3.04.2008); Опубл. (10.12.2009).

90. Патент US 3858492 A Flavor enhancement of milk foodstuffs / K. Masanobu, M. Noboru; Kyowa Hakko Kogyo Kk. – Заявл. (20.05.1971); Опубл. (7.01.1975).

91. Патент WO 2005067955 Antimicrobial activity from medicinal mushrooms / P. Stamets. – Заявл. (6.01.2004); Опубл. (28.06.2005).

92. Патент WO 2007078157, A1 *Fomitopsis pinicola* extract and a process for manufacturing the same / S.-D. Kim, H.-G. Lee, S.-I. Lee, S.-H. Oh; Eugene Bio Farm Co LTD. – Заявл. (5.01.2006); Опубл. (12.07.2007).

93. Патент WO 2007078161, A1 *Fomitopsos pinicola* extract having suppressive activity against pancreatic cell damage and the use there of / S.-D. Kim,

H.-G. Lee, S.-I. Lee, S.-H. Oh; Eugene Bio Farm Co LTD. – Заявл. (5.01.2006); Опубл. (12.07.2007).

94. Поединок, Н.Л. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий / Н.Л. Поединок, О.В. Ефременкова, О.Б. Михайлова, А.М. Негрейко // Успехи медицинской микологии. - 2007. – Т. 9. - С. 176-178.

95. Поединок, Н.Л. Рост и плодоношение *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. в результате воздействия аргонового и гелий-неонового лазера / Н.Л. Поединок, А.М. Негрейко // Микология и фитопатология. - 2004. – Т. 38, № 3. – С. 66-78.

96. Поєдинок, Н.Л. Вплив на проростання базидіоспор і ріст монокаріотичних культур їстівного лікарського гриба *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. низькоінтенсивного лазерного випромінювання / Н.Л. Поєдинок, А.М. Негрійко, А.С. Бухало и др. // Укр. бот. журн. - 2001. – Т. 58, № 4. – С. 235-239.

97. Поєдинок, Н.Л. Проростання базидіоспор їстівного гриба *Hericium erinaceus* (Bull.Fr.) Pers. (*Apyllophoromycetideae*) за різних умов зберігання / Н.Л. Поєдинок // Биотехнология. - 2002. – Т. 59, № 3. – С. 304-308.

98. Псурцева, Н.В. Эколого-таксономические предпосылки получения плодовых тел в культутре макромицетов, представляющих интерес для медицины / Н.В. Псурцева, А.А. Кияшко, Н.В. Шахова // Успехи медицинской микологии. 2007. - Т. 9. — С. 254-258.

99. Рабинович, М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов: В 2 книгах / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко. - М.: Наука, 2001. – Кн. 1. − 264 с.

100. Решетникова, И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами / И.А. Решетникова. - М.: Фактор, 1997 — 197 с.

101. Рогов, И.А. Общая технология мяса и мясопродуктов / И.А. Рогов, А.Г. Забашта, Г.П. Казюлин. - М.: Колос, 2000. - 367 с.

102. Рогов, И.А. Химия пищи. Принципы формирования качества мясопродуктов / И.А. Рогов, А.И. Жаринов, М.П. Воякин. - СПб.: РАПП, 2008. – 338 с.

103. Садыкова, В.С. Антимикробная активность грибов рода *Trichoderma* и *Trametes* в отношении патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus* / В.С. Садыкова, Г.К. Ковалева, Н.М. Чижмотря и др. // Сибирский медицинский журнал. - 2006. – Т. 66, № 8. – С. 18-20.

104. Сафонов, М.А. Трутовые грибы Оренбургской области: Монография / М.А. Сафонов. Оренбург: Изд-во ОГПУ, 2000. - 152 с.

105. Сидоренко, М.Л. Оптимизация среды для глубинного культивирования мицелия *Fomitopsis officinalis* / М.Л. Сидоренко // Успехи медицинской микологии. - 2006. – Т. 7. – С. 304-306.

106. Сидоренко, М.Л. Поиск новых видов сырья для антибактериальных препаратов / М.Л. Сидоренко, Л.С. Бузолева // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – Т. 57, № 5-6. – С. 7-10.

107. Сидоров, М.А. Микробиология мяса и мясопродуктов / М.А. Сидоров, Р.П. Корнелаева. - М.: Колос, 1996. - 240 с.

108. Скворцова, М.М. Иммунотропные свойства БАД «Трамелан». Биохимические, медико-биологические и клинические исследования / М.М. Скворцова, Е.С. Горшина // Успехи медицинской микологии. - 2006. – Т. 7. – С. 206-209.

109. Снежко, А.Г. Перспективные направления применения покрытий из природных полимеров / А.Г. Снежко, М.И. Губанова, Г.В. Семенов // Мясная индустрия. - 2011. - № 8. – С. 43-46.

110. Стахеев, И.В. Биотехнология производства малотоннажного производства микробного протеина / И.В. Стахеев, И.Э. Коломиец, Н.А. Здор. - Минск: Наука и техника, 1991. - 264 с.

111. Сухомлин, М.М. Комплекс морфологічних ознак при схрещуванні сумісних та несумісних монокаріотів гриба *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quel. / М.М. Сухомлин // Укр. бот. журн. - 1998. – Т. 55, № 1. – С. 75-82.

112. Телятьев, В.В. Целебные клады. Растения, продукты животного и минерального происхождения Центральной Сибири и их лечебные свойства / В.В. Телятьев. - Иркутск: Сиб. книж. изд-во, 1991. – 400 с.

113. Теоретические основы пищевых технологий: В 2-х книгах / под ред. В.А. Панфилова. – М.: КолосС, 2009. – Кн. 2. – 800 с.

114. Тимошенко, Н.В. Функционально-технологические свойства мяса: метод. указания / Н.В. Тимошенко, А.М. Патиева, С.В. Патиев, А.А. Нестеренко. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – 26 с.

115. Тренин, А.С. Возможность создания новых лекарственных препаратов на основе базидиальных грибов / А.С. Тренин, Н.Ю. Кац, Е.А. Цвигун и др. // Биотехнология и качество жизни. – 2014. – С. 146-147.

116. Ушанова, В.М. Массообменные процессы: учеб. пособие / В.М. Ушанова, Л.И. Ченцова, М.Н. Шайхутдинова, и др. – Красноярск, 2004. - Ч. 1. - 207с.

117. Феофилова, Е.П. Достижения и проблемы новой области биотехнологии: получение медицинских препаратов на основе биологически активных веществ мицелиальных грибов / Е.П. Феофилова, В.М. Терешина, А.С. Меморская // Успехи медицинской микологии. - 2001. - Т. 1. - С. 254 – 256.

118. Хорольский, В.В. Дрожжи и мицелиальные грибы впроизводстве мясных продуктов / В.В. Хорольский, А.Н. Габараев, Н.Г. Машенцева и др. // Мясная индустрия. - 2006. - № 9. – С. 32-34.

119. Черемных, Е.Г. Инфузории пробуют пищу / Е.Г. Черемных, Е.И. Симбирева // Химия жизни. - 2009. - № 1. - С. 28-31.

120. Черемных, Е.Г. Применение в токсикологических исследованиях автоматического прибора биотестирования / Е.Г. Черемных // Партнеры и конкуренты. - 2003. - №11.

121. Чхенкели, В.А. Антимикробное действие дереворазрушающего гриба *Coriolus pubescens* (Shum.: Fr.) Quel. / В.А.Чхенкели, Т.И. Никифорова, Р.Г. Скворцова // Микология и фитопатология. - 1998. – Т. 32, № 1. – С. 69-71.

122. Чхенкели, В.А. Биологически активные вещества базидиомицета *Coriolus pubescens* (Schum.: Fr.) Quel. и их использование: монография / В.А. Чхенкели. – Новосибирск, 2006. – 287 с.

123. Чхенкели, В.А. Некоторые аспекты изучения антимикробной активности грибов-ксилотрофов рода *Trametes* / В.А. Чхенкели, Н.А. Горяева, Л.Г. Чхенкели и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2007. - Т. 101, № 2. – С. 82-86.

124. Чхенкели, В.А. Противотуберкулезная активность базидиомицета *Coriolus pubescens* (Shum.: Fr.) Quel. и препарата, получаемого на его основе / В.А.Чхенкели, Н.А. Шниль // Сибирский медицинский журнал. - 2005. – Т. 50, № 1. – С. 67-71.

125. Шариков, А.М. Бактерицидная активность метаболитов гриба *Fomitopsis officinalis* в отношении условно-патогенных бактерий / А.М. Шариков, У.С. Ооржак, О.В. Перьянова // Грибы в природных и антропогенных экосистемах. - 2005. – Т. 2. – С. 304-307.

126. Шахов, А.А. Фотоэнергетика растений и урожай / А.А. Шахов. - М.: Наука, 1993. - 415 с.

127. Шеин, А.А. Влияние акустических воздействий на структурные перестройки водных кластеров и водно-солевых надмолекулярных клатеров, и, как следствие, на продуктивность и солеустойчивость *Phalarodies arumdinacea* (L) / А.А. Шеин, Б.М. Кершенгольц // Наука и образование. - 2006. - № 2. - С. 23-28.

128. Шеин, А.А. Физиолого-биохимические аспекты формирования солеустойчивости в ответ на действие экзогенных физических факторов / А.А. Шеин, Б.М. Кершенгольц // Вестник ЯГУ. - 2006. – Т. 3. – С. 18-26.

129. Шиляев, А.С. Физические основыприменения ультразвука в медицине и экологии / А.С. Шиляев, С.П. Кундас, А.С. Сткин // Минск: Изд-во международного государственного экологического университета им. А.Д. Сахарова, 2009. - 109 с.

130. Шипулин, В.И. Антимикробные препараты в производстве колбас / В.И. Шипулин, А.В. Серов, И.М. Шевченко // Мясная индустрия. - 2009. - № 4. – С. 63-65.

131. Щерба, В.В. Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов / В.В. Щерба, В.Г. Бобицкая // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 90-95.

132. Щерба, В.В. Углеводы глубинного мицелия высших базидиомицетов / В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // Прикладная биохимия и микробиология. - 2004. - Т. 40, № 6. - С. 634-638.

133. Эльпинер, И.Е. Биофизика ультразвука / И.Е. Эльпинер. - М.: Наука, 1973. – 384 с.

134. Alapont, C. Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants / C. Alapont, M.C. Lopez-Mendoza, J.V. Gil, P.V. Martinez-Culebras // Food Addit. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. - 2014. – V. 31, № 1. – P. 93-104.

135. Altunatmaz, D.K. Detection of airbone psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators / D.K. Altunatmaz, G. Issa, A. Aydin // Braz. J. Microbiol. - 2012. – V. 43, № 4. – P. 1436-1443.

136. Alves, M.J. A review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds / M.J. Alves, I.C. Ferreira, J. Dias et. al // Planta Med. - 2012. – V. 78, № 16. – P. 1707-1718.

137. Andrade, M.J. Inhibitions of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meatproducts / M.J. Andrade, L. Thorsen, A. Rodriguez et. al // Int. J. Food Microbiol. - 2014. – V. 170. – P. 70-77.

138. Aquilanti, L. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation / L. Aquilanti, S. Santarelli, G. Silvestry et. al // Int. J. Food Microbiol. - 2007. – V. 120, № 1-2. – P. 136-145.

139. Arbunhosa, L. A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and Estimation of probable daily intakes / L. Arbunhosa, H. Moraless, C. Soares // Crit.Rev. Food Sci. Nutr. - 2014. – July.

140. Asatiani, M.D. Antioxidant and free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from aphyllophoroid mushrooms / M.D. Asatiani, V. Elisashvili, S.P. Vasser et. al // Mycol. Balkan. - 2007. – Vol. 4. – P. 45-50.

141. Asefa, D.T. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dtry-cured meat production facility / D.T. Asefa, C.F. Cure, R.O. Gjerde // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – V. 140, № 2-3. – P. 131-135.

142. Badalyan, S.M. Role of peg formation in clamp cell fusion of homobasidiomycete fungi / S.M. Badalyan, E. Polak, R. Hermann et. al // J. Basic Microbiol. – 2004. – V. 44, № 3. – P. 167-177.

143. Baker, R.C. Framework for managing mycotoxin risks in the food industry / R.C. Baker, R.M. Ford, M.E. Helander // J. Food Prot. - 2014. – V. 77, № 12. – P. 2181-2188.

144. Balaquer, M.P. Antifungal properties of gliadin film incorporating cinnamaldehyde and application in active food packing of bread and cheese spread foodstuffs / M.P. Balaquer, G. Lopez-Carballo, P. Catala et. al // Int. J. Food Microbiol. - 2013. – V. 166, № 3. – P. 369-377.

145. Bano, Z. Review. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food / Z. Bano, S. Rajarathnam // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 1988. – V. 27, № 2. - P. 87-158.

146. Battilani, P. *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants / P. Battilani, A. Pietri, P. Giorni et. al // J. Food Prot. - 2007. – V. 70, № 4. – P. 975-980.

147. Benito, M.J. Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages / M.J. Benito, M.J. Serradilla, S. Ruiz-Moyano et. al // Meat Sci. - 2008. – V. 80, № 3. – P. 656-661.

148. Bisen, P.S. *Lentinus edodes:* a macrofungus with pharmacological activities / P.S. Bisen, R.K. Baghel, B.S. Sanodiya // Curr. Med. Chem. - 2010. – V. 17, № 22. – P. 2419-2430.

149. Buchalo, A. Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures / A. Buchalo, O. Mykchaylova, M. Lomberg, S.P. Wasser. - Kiev: Alterpress, 2009. - 224 p.

150. Bulakh, E.M. Medicinal mushrooms of the Russian Far East in nature / E.M. Bulakh // Internat. J. Med. Mushrooms. - 2001. - V. 3. - P. 125.

151. Bun, T.N. Polysaccharopeptide from the turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát inhibits human immunodeficiency virus type 1 reverse Transciptase and Protease / T.N. Bun, W. Hexiang, D.C. Wan // Int. J. Med. Mushrooms. - 2006. – V. 8, № 1. – P. 39-44.

152. Bun, T.N. Are view of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (*Basidiomycetes: Polyporaceae*) / T.N. Bun // Gen. Pharmacol. - 1998. – V. 30, № 1. – P.1-4.

153. Can, F.O. Decontamination of hard cheeses by pulsed UV light / F.O. Can, A. Demirci, V.M. Puri, H. Gourama // J. Food Prod. - 2014. – V. 77, № 10. - P. 1723-1731.

154. Cano-Garcia, L. Generation of aroma compounds in a fermented saysage meat model system by *Debariomyces hansenii* strains / L. Cano-Garcia, S. Rivera-Jimenez, C. Belloch, M. Flores // Food Chem. - 2014. – V. 151. – P. 364-373.

155. Carpentier, B. La contamination microbienne des surfaces en indutrie agro-alimentaire // Vide. Sci. - 2001. - V. 56, № 299 - P. 110-116.

156. Chang, S.T. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact / S.T. Chang, Ph.G. Miles. – London, etc.: CRC Press, 2004. – 451 p.

157. Chen, J. A study on the antioxidant effect of *Coriolus versicolor* polysaccharide in rat brain tissues / J. Chen, X. Jin, L. Zhang, L. Yang // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. - 2013. - V. 10, № 6. – P. 481-484.

158. Cheung, H. T. Triterpene metabolite of *Trametes stowardii* / H.T. Cheung, J. C. F. Seeto, T. R. Watson // Austr. J. Chem. - 1973. – Vol. 26. – P. 609-618.

159. Chiba, T. Fomiroid A, a novel compound from the mushroom *Fomitopsis nigra*, inhibits NPC1L1-Mediated cholesterol uptake via mode of action distinct from that of ezitimibe / T. Chiba, T. Sakurada, R. Watanabe et. el // PloS One. - 2014. – V. 9, № 12.

160. Chihara, G. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes (*Berk.)Sing. (an edible mushroom) / G. Chihara, J. Hamuro, Y. Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka // Canc. Res. - 1970. – V. 30. – P. 2776-2781.

161. Chlebicki, A. *Fomitopsis officinalis* on Siberian larch in the Urals / A. Chlebicki, V.A. Mukhin, N. Ushakova // Mycologist. - 2003. – V. 17. - P. 116-120.

162. Chu, K.K. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values / K.K. Chu, S.S. Ho, A.H. Chow // J. Clin. Pharmacol. - 2002. – V. 42, № 9. – P. 976-984.

163. Cui, J. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production / J. Cui, Y. Chisti // Biotech. Adv. - 2003. - V. 21, № 2. – P. 109-122.

164. Danko, S.F. Biophysical enhancement of barley germination for diet food malt / S.F. Danko, E.P. Zarubinabina, T.N. Danilchuk, D.N. Yur'ev // Ernarung Forschung. - 2000. - V. 45 (3). – P. 186-187. 132

165. Donatini, B. Control of oral human papilomavirus (HPV) by medicinal mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: a preliminary clinical trail / B. Donatini // Int. J. Med. Mushrooms. - 2014. – V. 16, № 5. – P. 497-498.

166. Edwards, C.G. Inducing malolactic fermentation in wines / C.G. Edwards, R.B. Beelman // Biotechnol. Adv. – 1989. – V. 7, № 3. – P. 333-360.

167. Elisashvili, V. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes / V. Elisashvili, E. Kachlishvili, T. Khardziani, S.N. Agathos // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2010. – V. 37, № 10. – P. 1091-1096.

168. Federici, S. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy / S. Federici, F. Ciarrocchi, R. Campana et. al // Meat Sci. - 2014. – V. 98, № 4. – P. 575-584.

169. Fisher, M. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy / M. Fisher, L. X. Yang // Antican. Res. - 2002. - V. 22, № 3. - P. 1737– 1754.

170. Gai, Y.P. Involvement of ligninolytic enzymes in degradation of wheat straw by *Trametes trogii* / Y.P. Gai, W.T. Zhang, Z.M. Mu, X.L. Ji // J. Appl. Microbiol. - 2014. - V. 117, № 1. – P. 85-95.

171. Galvalisi, U. *Penicillium* species present in Uruguayan salami / U. Galvalisi, S. Lupo, J. Piccini, L. Bettucci // Rev. Arqent. Microbiol. - 2012. - V. 44, № 1. – P. 36-42.

172. Gao, Y. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (*Aphyllophoromycetideae*): a review / Y. Gao, S. Zhou, M. Huang, A. Xu // Int. J. Med. Mushrooms. - 2003. – V. 5. –P. 235-246.

173. Grienke, U. European medicinal polypores – a modern view on traditional uses / U. Grienke, M. Zoll, U. Peintner, J.M. Rollinger // J. Ethnopharmacol. - 2014. – V. 154, № 3. – P. 564-583.

174. Grzywnowicz, K. Medicinal Mushrooms in Polish Falk Medicine // Intern. J. Med. Mushr. – 2001. – V. 3. – P. 154.

175. Guler, P. Antifungal activities of *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr) Karst and *Lactarius vellereus* (Pers.) Fr. / P. Guler, I. Akata, F. Kutluer // Academic J. - 2009. – V. 8, № 16. – P. 3811-3813.

176. Haubrich, W.S. Medical Meanings: A Glossary of Word Origins (2nd ed.) / W.S. Haubrich. - Philadelphia: American College of Physicians, 2003. – 175 p.

177. Hirose, K. A biological response modifier, PSK, inhibits reverse transcriptase *in vitro* / K. Hirose, M. Hakozaki, J. Kakuchi et. al // Biochem. Biophys. Res. Com. - 1987. – V. 149, № 2. –562 p.

178. Hobbs, Ch. Medicinal mushrooms / Ch. Hobbs. - Loveland: Inter. Press, 1996. – 252 p.

179. Hobbs, Ch. Medicinal value of turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (*Aphyllophoromycetideae*) / Ch. Hobbs // Int. J. Med. Mushrooms. - 2004. – V. 6, № 3. – P. 287-302.

180. Hsieh, T.C. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by the combinations of *Coriolus versicolor* and *Ganoderma lucidum* / T.C. Hsieh, J.M. Wu // Int. J. Mol. Med. - 2013. – V. 32, № 1. – P. 251-257.

181. http://www.indexfungorum.org/

182. http://www.mycobank.org/

183. Hwang, C.H. Chlorinated coumarines from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis* / C.H. Hwang, B.U. Jaki, L.L.Klein et. al // J. Nat. Prod. - 2013. – V. 76, № 10. – P. 1916-1922.

184. Jiménez-Medina, E. The immunomodulator PSK induces *in vitro* cytotoxic activity in tumour cell lines viaarrest of cell cycleand induction of apoptosis / E. Jiménez-Medina, E. Berruguilla, I. Romero et. al // BMC Cancer. - 2008. – V. 8. – P. 78.

185. Kaluoncu, F. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species / F. Kaluoncu, M. Oskay, H. Saglam et. al // J. Med. Food. - 2010. – V. 13, № 2. – P. 415-419.

186. Kanazawa, M. Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients / M. Kanazawa, K. Yoshihara, H. Abe et. Al // Antican. Res. - 2005. - V. 25, № 1B. – P. 443- 449

187. Keller, A.C. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola* / A.C. Keller, M.P. Maillard, K. Hostettman // Phytochem. - 1996. – V. 41. – P. 1041– 1046.

188. Kim, B.K. Effects of a hot water extract of *Trametes versicolor* on the recovery of rat liver function / B. K. Kim et al. // Int. J. Med. Mushrooms - 2000. – V. 2, № 1. – P. 35-44.

189. Kirk, P.M. Dictionary of the *Fungi* (10th ed.) / P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers. - Wallington: CABI, 2008. –505 p.

190. Kobayashi, H. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview / H. Kobayashi, K. Matsunaga, Y. Oguchi // Canc. Epidem. Biomarkers Prev. - 1995. - V. 4, № 3. - P. 275–281.

191. Komatsu, N. Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activites / N. Komatsu, H. Terakawa, K. Nakanishi, Y. Watanabe // J. Antibiot. - 1983. - V. 55, № 3. – P. 257-270.

192. Kozlovsky, A.G. Exo-metabolites of mycelia fungi isolated in production premises of cheese-making and meat-processing plants / A.G. Kozlovsky, V.P. Zhalifonova, T.V. Antipova et. al // Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. - 2014. – V. 31, № 2. – P. 300-306.

193. Krupodorova, T. Antiviral activity of *Basidiomycete* mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture / T. Krupodorova, S. Rybalko, V. Barshteyn // Virol. Sin. - 2009. – V. 29, № 5. – P. 284-290.

194. Krysińska-Traczyk, E. Polish. Filamentous fungi and mycotoxins as potential occupational risk factors among farmers harvesting various crops / E. Krysińska-Traczyk, J. Perkowski, M. Kostecki et. al // Med. Pr. – 2003. V. 54, № 2. P. 133-138.

195. Lee, K. *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* enhance the growth and survival of Shiga toxin producing *Esherihia coli* O157 under mild acidic conditions / K. Lee, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi et. al // J. Food Sci. - 2012. – V. 77, № 2. – P. 102-107.

196. Lemmens, M. Mykotoxine Gefahr fur Nutztiere / M. Lemmens // Fortschr. Landwirt. - 2000. - № 19. - P. 9-11.

197. Li, F. Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor* / F. Li, H. Wen, Y. Zhang // Sci. China Life Sci. - 2011. – V. 54, № 4. – P. 379-385.

198. Li, G. Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers / G. Li, K. Yu, F. Li et. al // J. Ethnopharmacol. - 2014. – V. 153, № 2. – P. 521-530.

199. Liang, Z. Chemical characterization and antitumor activities of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* / Z. Liang, Y. Yi, Y. Guo et. al // int. J. Mol. Sci. – 2014. – V. 15, № 5. – P. 9103-9116.

200. Liebert, M.A. Medicinal mushrooms / M. A. Liebert // Alternat. Complem. Therap. - 2011. – V. 17, № 6. – P. 323-328.

201. Lin, L. Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhison* cells using low-energy ultrasound / L. Lin, J. Wu // Diotech. Bioengin. - 2002. - V. 78, № 1. – P. 81-88.

202. Lindequist, U. The pharmacological potential of mushrooms / U. Lindequist, T.H.J. Niedermeyer, W.D. Julich // Evid. Complem. Altern. Med. - 2008. - V. 2, № 3. – P. 285-299.

203. Logrieco, A. DNA arrays, electronic noses and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi andmycotoxins: a review / A. Logrico, D.W. Arrigan, K. Brengel-Pesce // Food Addit. Contam. – 2005. - V. 22, № 4. – P. 335-344.

204. Lopez, O.V. Potassium sorbate controlled release from corn starch films / O.V. Lopez, L. Giannuzzi, N.E. Zaritzky, M.Z. Garcia // Mater Sci. Eng. C Mater Biol. Appl. – 2012. - V. 33, № 3. – P. 1583-1591.

205. Lozano-Ojalvo, D. Characterization and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages / D. Lozano-Ojalvo, A. Rodrigues, M. Cordero et. al // Meat Sci. - 2014. - V. 100. – P. 283-290.

206. Lu, H. Polysaccharide Krestin is a novel TLR2 agonist that mediates inhibition of tumor growth via stimulation of CD8 T cells and NK cells / H. Lu, Y. Yang, E. Gad et al. // Clin. Canc. Res. - 2011. - V. 17, № 1. – P. 67–76.

207. Luszczynski, J. *Fomitopsis officinalis* (Coriolaceae) in Poland / J. Luszczynski // Fragm. Florist. Polonica. - 2000. – V. 7. – P. 271-276.

208. Maruyama, S. Protein bound polysaccharide-K (PSK) directly enhanced IgM production in the human B cell line BALL-1 / S. Maruyama, T. Akasaka, K. Yamada, H. Tachibana // Biomed. Pharmacother. - 2009. – V. 63, № 6. – P. 409-412.

209. Majewski, T. An attempt to identify to cryptogamic plants in Syreniusz's herbal // T. Majewski / Kwart Hist Nauki Tech. – 2005. - V. 50, № 3-4. - P. 183-196.

210. Molitoris, H.P. Mushrooms in medicine / H.P. Molitoris // Folia Microbiology. - 1994. – V. 39, № 2. – P. 91-98.

211. Mothana, R.A Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* / R.A. Mothana, N.A. Awadhali, R. Jansen et. al / Fitoterapia. – 2003. – V. 74, № 1-2. – P. 177-180.

212. Mukhin, V.A. Distribution, frequency and biology of *Laricifomes officinalis* in the Asian part of Russia / V.A. Mukhin, H. Kotiranta, H. Knudsen, N.V. Ushakova // Микология и фитопатология. - 2005. - Т. 39, № 5. – С. 34-42.

213. Okuzawa, M. PSK, a protein-bound polysaccharide overcomes defective maturation of dendritic cells exposed to tumour-derived factors *in vitro* / M. Okuzawa, H. Shinohara, T. Kobayashi et al. // Int. J. Oncol. - 2002. – V. 20. – P. 1189-1195.

214. Ooi, V.E.C. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides / V.E.C. Ooi, F. Liu // Int. J. Med. Mushrooms. - 1999. – V. 1, № 3. – P. 195-206.

215. Osei, A.A.A. The population change of yeasts in commercial salami / A.A.A. Osei, E. Laing, A. Hugo, B.C. Vijoen / Food Microbiol. — 2000. — V. 17, № 4. — P. 429-438.

216. Papagianni, M. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgiovense* / M. Papagianni, D. Sergelidis // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2014. – V. 172, № 8. – P. 3926-3938.

217. Park, N. Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitoposis pinicola* mycelia / N. Park, S.S. Park // Int. J. Biol. Macromol. - 2014. - V. 70. – P. 583-589.

218. Perrone, G. *Penicillium salami*, a new species occurring during seasoning of dry cured meat / G. Perrone, R.A. Samson, J.C. Frisvad et. al // Food microbial. - 2015. – V. 193. – P. 91-98.

219. Phan, C.W. Lipid constituents of edible mushroom, *Pleurotus giganteus* demonstrate anti-*Candida* activity / C.W. Phan, G.S. Lee, I.G. Macreadie et. al // Nat. Prod. Commun. - 2013. – V. 8, № 12. – P. 1763-1765.

220. Pitt, J.I. Mycotoxins and toxigenic fungi / J.I. Pitt, J.C. Basílico, M.L. Abarca et. al // Medical Mycology. - 2000. - V. 38, № 1. - P. 41–46.

221. Popova, M. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea* / M. Popova, B. Trusheva, M. Gyosheva et. al // Fititerapia. - 2009. – V. 80, № 5. – P. 263-266.

222. Popovic, V. Mycoterapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action / V. Popovic, J. Zivkovic, S. Davidovic et. al // Curr. Top Med. Chem. - 2013. – V. 13, № 21. – P. 2791-2806.

223. Poyedinok, N.L. A. The action of argon and Helium-Neon laser radiation on growth and fructifi cation of culinary-medicinal mushrooms *Pleurotus ostereatus, Lentinus edodes* and *Hericium erinaceus* / N.L. Poyedinok, A.S. Buchalo, A. Negrijko // Ibid. - 2003. – V. 5, № 4. – P. 251-257.

224. Poyedinok, N.L. Influence of lowintensity lasar radiation on the growth and development of *Hericiun erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. / N.L. Poyedinok, A. Negrijko, J. Potemkina // Int. J. Med. Mushrooms. - 2001. – V. 3, № 3. – P. 199.

225. Poyedinok, N.L. Prospects of application low intensity laser light in biotechnologies of cultivation of edible mushrooms / N.L. Poyedinok // Int. J. Med. Mushrooms. - 2005. – V. 7, № 5. – P. 448-452.

226. Poyedinok, N.L. Stimulation with lowintensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mashroom *Hericium erinaecus* (Bull.: Fr.) Pers. (*Aphyllophoromycetideae*) / N.L. Poyedinok, A. Negrijko, J.V.Potemkina // Ibid. - 2000. – V. 2, № 4. – P. 339-342.

227. Purschwitz, J. Seeing the rainbow: light sensing in fungi / J. Purschwitz, S. Muller, Ch. Kastner, R. Fischer // Curr. Opin. Microbiol. - 2006. – V. 9. – P. 566-571.

228. Pang, Z.J. Polysaccharide Krestin enhances manganese superoxidedismutase activity and mRNA expression inmouseperitoneal macrophages / Z.J. Pang, Y. Chen, M. Zhou // Amer. J. Chin. Med. - 2000. – V. 28. – P. 331-341.

229. Quang, D.N. Lanostane triterpinoids from the inedible mushroom *Fomitopsis spraguei* / D.N. Quang, Y. Arakawa, T. Hashimoto, Y. Asakawa // Phytochem. - 2005. – V. 66. – P. 1656–1661.

230. Quayle, K. The TLR2 agonist in polysaccharide-K is a structurally distinct lipid which acts synergistically with the protein-bound ß-glucan / K. Quayle, C. Coy, L. Standish, H. Lu // J. Nat. Med. - 2014. – December.

231. Ramkumar, L. Antioxidant and radical scavenging activity of nine edible mushrooms extract / L. Ramkumar, T. Ramanathan, P. Thirunavukkarasu, N. Arivuselvan // Intern. J. Pharm. – 2010. – V. 6. – P. 950-953.

232. Rau, U. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* ATCC 200801 / U. Rau, A. Kuenz, V. Wray et. al / Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 81, № 5. – P. 827-837.

233. Ren, L. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review / L. Ren, C. Perera, Y. Hemar // Food Funct. - 2012. – V. 3, № 11. – P. 1118-1130.

234. Reshetnikov, S.V. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review) / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K.K. Tan // Ibid. – 2001. – 3, № 4. – P. 361-394.

235. Rouhana-Toubi, A. Inhibitory effect of ethyl acetate extract of the shaggy in cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (Higher *Basidiomycetes*) fruit bodies on cell growth of human ovarian cancer / A. Rouhana-Toubi, S.P. Wasser, A. Agbarya, F. Fares // Int. J. Med. Mushrooms. – 2013. – V. 15, № 5. – P. 457-470.

236. Ruiz-Moyano, S. *Lactobacillus reuteri* implantation ability of the potential probiotic strain PL519, in “Salchichon: a traditional Iberian dry fermented sausage / S. Ruiz-Moyano, A. Martin, M.J. Benito et. al // J. Food Sci. - 2011. – V. 76, № 5. – P. 268-275.

237. Ruiz-Moyano, S. Safety and functional aspects of preselected enterococci for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages / S. Ruiz-Moyano, a. Martin, M.J. Benito et. al // J. Food Sci. 2009. – V. 74, № 7. – P. 398-404.

238. Sakagami, H. Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. in: Mushroom Biology and Mushroom Products / H. Sakagami, M. Takeda. - Hong Kong: Chinese University Press, 1993. – P. 237-245.

239. Samson, R.A. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial beta-tubulin sequences / R.A. Samson, K.A. Seifert, A.F. Kuijpers et. al // Stud. Mycol. - 2004. – V. 49. – P. 175-200.

240. Scarpari, M. Aflatoxin control in maize by *Trametes versicolor* / m. Scarpari, C. Bello, C. Pietricola et. al // Toxins (Basel). – 2014. - V. 6, № 12. – P. 3426-3437.

241. Selvi, S. *In vitro* antioxidant and antilipidperoxidative potential of *Pleurotus florida* / S. Selvi, P. Chinnaswamy // Anc. Sci. Life. – 2007. – V. 26, № 4. – P. 11-17.

242. Shibata, M. PSK decreased FOLFOX4-induced peripheral neuropathy and bone marrow suppression in patients with metastatic colorectal cancer / M. Shibata, T. Shimura, Y. Nishina et al. // Gan To Kagaku Ryoho. - 2011. – V. 38. – P. 797-801.

243. Silvestri, G. Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGEV / G. Silvestri, S. Satarelli, L. Aquilanti et. al // Meat Sci. - 2007. – V. 77, № 3. – P. 413-423.

244. Sonjak, S. Salting of dry-cured meat – a potential cause of contamination with the ochratoxin A – producing species *Penicillium nordicum* / S. Sonjak, M. Licen, J.C. Frisvad, N. Gunde-Cimerman // Food Microbiol. - 2011. - V. 28, № 6. – P. 1111-1116.

245. Sonjak, S. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia / S. Sonjak, M. Licen, J.C. Frisvad, N. Gunde-Cimerman // Food Microbiol. - 2011. – V. 28, № 3. – P. 373-376.

246. Sorensen, L.M. Mycobiota in the processing areas of two different meat products / L.M. Sorensen, T. Jacobsen, P.V. Nielsen et. al // Int. J. Food Microbiol. - 2008. – V. 124, № 1. – P. 58-64.

247. Stamets, P. Novel antimicrobials from mushrooms / P. Stamets // Herbal Gram. - 2002. – V. 54. – P. 29-33.

248. Standish, L.J. Botanical medicine in integrative oncology / L.J. Standish, L.N. Alschuler, A.B. Ready et al. - New York: Oxford University Press, 2009. - P. 104–146.

249. Standish, L.J. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer / L.J. Standish, C.A. Wenner, E.S. Sweet et. al // J. Soc. Integr. Oncol. 2008. – V. 6, № 3. – P. 122-128.

250. Teplyakova, T.V. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher *Basidiomycetes*) from Altai Mountains (Russia) / T.V. Teplyakova, N.V. Psurtseva, T.A. Kosogova et. al // Int. J. Med. Mushrooms. - 2012. - V. 14, № 1. - P. 37-45.

251. Tindall, J . The effectiveness of *Coriolus versicolor* supplementation in the treatment of Kaposi sarcoma in HIV / J. Tindall, E. Clegg // 10th International Congress of Mucosal Immunology. - 1999.

252. Toi, M. Randomized adjuvant trial to evaluate the addition of tamoxifen and PSK to chemotherapy in patients with primary breast cancer: 5-year results from the Nishi-Nippon group of the adjuvant chemoendocrine therapy for breast cancer organization / M. Toi, T. Hattori, M. Akagi et al. // Cancer. - 1992. - V. 70, № 10. - P. 2475–2483.

253. Toledano, A. Proteolytic activity of lactic acid bacteria strains and fungal biota forpotential use as starter cultures in dry-cured ham / A. Toledano, R. Jordano, C. Lopez, L.M. Medina // Int. J. Food. Prot. - 2011. – V. 74, № 5. – P. 826-829.

254. Vamanu, E. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two edible mushroom mycelia obtained in the presence of different nitrogen sources / E. Vamanu // J. Med. Food. - 2013. – V. 16, № 2. – P. 155-166.

255. Vazirian, M. Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher *Basidiomycetes*) and its main compounds / M. Vasirian, M.A. Faramarzi, S.E. Ebrahimi et. al // Int. J. Med. Mushrooms. - 2014. – V. 16, № 1. – P. 77-84.

256. Vetvicka, V. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts / V. Vetvicka, J. Vetvickova // Ann. Transl. Med. - 2014. – V. 2, № 2. – P. 14.

257. Wang, Y. Investigating migration inhibition and apoptotic effects of *Fomitopsis pinicola* chloroform extract on human colorectal cancer SW-480 cells / Y. Wang, X. Cheng, P. Wang et. al // PLoS One. - 2014. – V. 9, № 7.

258. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // Appl. Microbiol. Biotech. - 2002. – V. 60, № 3. – P. 258–274.

259. Wenner, C.A. Polysaccharide-K augments doxetaxel-induced tumor suppression and antitumor immune response in an immunocompetent murine model of human prostate cancer / C.A. Wenner, M.R. Martzen, H. Lu et. al // Int. J. Oncol. - 2012. – V. 40, № 4. – P. 905-913.

260. Wu, H.T. *In vivo* and *in vitro* anti-tumor effects of fungal extracts / H.T. Wu, F.H. Lu, Y.C. Su et. al // Molecules. - 2014. – V. 19, № 2. - P. 2546-2556.

261. Yadomae, T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans / T. Yadomae, Y. Zasshi // Rev. Jap. – 2000. – V. 120, № 5. – P. 413-431.

262. Zhang, J. Immune-enhancing activity comparison of sulfated ophiopogon polysaccharide and sulfated jujube polysaccharide / J. Zhang, J. Chen, D. Wang et. al // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – V. 52. – P. 212-217.

263. Zhang, M. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolating process, structural characteristics and antitumor activity / M. Zhang, S.W. Cui, P.C.K. Cheung, Q. Wang // Trends Food Sci. Tech. - 2007. – V. 18. – P. 4-19.

264. Zhang, H. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius* / H. Zhang, H. Ma, W. Liu et. al // Carbohydr. Polym. – 2014. – V. 113. – P. 380-387.

265. Zhao, F. Triterpinoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities / F. Zhao, Q. Mai, J. Ma et. al // Fitoterapia. - 2014. - V. 101. – P. 34-40.

266. Zhong, X.H. Effects of inotodiol extracts from *Inonotus obliquus* on proliferation cycle and apoptotic gene of human lung adenocarcinoma cell line A549 / X.H. Zhong, L.B. Wang, D.Z. Sun // Chin. J. Integr. Med. - 2011. – V. 17, № 3. – P. 218-223.

267. Zjawiony, J.K. Biologically active compounds from *Aphyllophorales* (*Polypore*) fungi / J.K. Zjawiony // J. Nat. Prod. - 2004. – V. 67. – P. 300-310.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Антибактериальная активность штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes*

Таблица 1 – Антагонистическая активность культуральных фильтратов штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)					
	Staphylococcus aureus 6538-P	*Bacillus coagulans* 429	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Listeria monocytogenes* 766	*Escherichia coli* M 17	*Candida albicans*
Trametes spp. B 08/06	0	0	0	0	8,6±0,1	0
Trametes spp. 03/99	0	0	0	0	7,2±0,2	0
Trametes spp. 12/91	0	0	0	0	7,0±0,1	0
*Trametes spp.*11/05	0	0	0	0	8,1±0,2	0
Trametes spp. 01/06	0	0	0	0	8,1±0,2	0
Trametesv spp. 02/06	0	0	0	0	7,5±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	0	0	0	0	7,3±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	0	0	0	0	7,6±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	0	0	0	0	7,9±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	0	0	0	0	7,4±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	0	0	0	0	7,9±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-2006	0	0	0	0	8,3±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	0	0	0	0	7,2±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	0	0	0	7,5±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	0	7,5±0,1	0	7,8±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	0	7,6±0,1	0	8,8±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	0	7,6±0,2	0	8,9±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	0	8,4±0,2	0	10,3±0,1	0

Таблица 2 – Антагонистическая активность спиртовых экстрактов штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)					
	*Staphylococcus aureus*6538-P	*Bacillus coagulans* 429	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Listeria monocytogenes* 766	*Escherichia coli* M 17	*Candida albicans*
Trametes spp. B 08/06	11,7±0,2	10,6±0,1	8,3±0,1	12,2±0,2	9,5±0,1	15,4±0,2
Trametes spp. 03/99	8,8±0,1	7,8±0,2	7,7±0,1	8,8±0,2	8,0±0,1	9,0±0,1
Trametes spp. 12/91	8,5±0,1	7,8±0,1	7,8±0,2	9,0±0,1	8,2±0,2	9,2±0,1
Trametes spp. 11/05	8,2±0,2	8,2±0,1	7,6±0,2	9,2±0,1	8,2±0,2	9,8±0,1
Trametes spp. 01/06	8,2±0,1	8,5±0,1	7,5±0,1	8,6±0,2	7,8±0,3	9,9±0,1
Trametes spp. 02/06	8,5±0,2	8,5±0,2	7,5±0,1	8,5±0,2	7,9±0,2	10,3±0,1
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	8,8±0,1	7,8±0,2	7,5±0,1	8,8±0,2	7,5±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	7,9±0,1	7,9±0,2	7,7±0,1	8,9±0,2	7,8±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	10,2±0,1	8,3±0,1	8,8±0,3	9,0±0,1	10,2±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	8,0±0,2	7,7±0,1	7,5±0,3	8,6±0,3	8,2±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	10,3±0,3	8,4±0,3	9,0±0,1	12,3±0,3	11,5±0,3	0
Fomitopsis spp. Tyv-2006	10,1±0,1	8,4±0,3	9,2±0,1	14,3±0,1	12,6±0,3	7,7±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	7,9±0,1	7,7±0,1	0	7,8±0,2	8,9±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	7,8±0,1	7,6±0,1	0	7,9±0,2	9,6±0,1	7,6±0,1
Fomitopsis spp. Fp-01/02	8,0±0,2	7,6±0,2	0	8,0±0,2	12,3±0,1	10,2±0,2
Fomitopsis spp. Fp-02/06	9,2±0,2	9,9±0,1	8,6±0,2	9,9±0,2	12,5±0,2	11,3±0,3
Fomitopsis spp. Fp-04/06	9,3±0,2	10,2±0,1	8,5±0,2	9,9±0,1	11,9±0,2	12,1±0,4
Fomitopsis spp. Fp-04/99	9,3±0,1	12,2±0,2	8,9±0,2	10,2±0,3	17,0±0,4	20,1±0,3

Таблица 3 – Антагонистическая активность водных экстрактов, полученных методом холодной экстракции, штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно патогенных и патогенных микроорганизмов

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)					
	*Staphylococcus aureus*6538-P	*Bacillus coagulans* 429	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Listeria monocytogenes* 766	*Escherichia coli* M 17	*Candida albicans*
Trametes spp. B 08/06	13,2±0,2	0	0	0	12,3±0,2	0
Trametes spp. 03/99	8,0±0,2	0	0	0	9,2±0,2	0
Trametes spp. 12/91	9,2±0,2	0	0	0	8,0±0,1	0
Trametes spp. 11/05	9,5±0,1	0	0	0	9,2±0,1	0
Trametes spp. 01/06	9,5±0,2	0	0	0	9,5±0,2	0
Trametes spp. 02/06	9,7±0,2	0	0	0	9,9±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	0	0	0	0	7,8±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	0	0	0	0	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	0	0	0	0	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	0	0	0	0	8,0±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	0	0	0	0	0	8,0±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-2006	0	0	0	0	8,3±0,1	14,3±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	0	0	0	0	0	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	0	0	0	0	0
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	0	0	0	0	0
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	0	0	0	7,7±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	0	0	0	7,8±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	0	0	0	8,6±0,2	0

Таблица 4 – Антагонистическая активность водных экстрактов, полученных методом исчерпывающей экстракции, штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно патогенных и патогенных микроорганизмов

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)					
	*Staphylococcus aureus*6538-P	*Bacillus coagulans* 429	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Listeria monocytogenes* 766	*Escherichia coli* M 17	*Candida albicans*
Trametes spp. B 08/06	11,5±0,1	11,8±0,1	11,4±0,2	8,2±0,1	14,6±0,3	0
Trametes spp. 03/99	10,2±0,1	9,8±0,1	8,9±0,1	7,6±0,1	8,8±0,2	0
Trametes spp. 12/91	9,8±0,2	7,6±0,2	0	7,7±0,1	9,2±0,2	0
Trametes spp. 11/05	9,9±0,2	7,5±0,2	0	0	7,8±0,1	0
Trametes spp. 01/06	10,0±0,1	9,9±0,2	9,5±0,2	7,6±0,2	7,9±0,1	0
Trametes spp. 02/06	9,9±0,1	9,5±0,2	10,2±0,2	7,9±0,1	7,9±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	0	7,6±0,1	0	0	7,6±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	0	7,9±0,1	0	0	8,8±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	0	8,3±0,1	0	0	9,2±0,2	9,9±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	0	8,0±0,2	0	0	8,7±0,1	10,2±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	0	10,1±0,2	0	0	10,2±0,1	11,0±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-2006	0	12,2±0,3	0	0	10,2±0,2	11,2±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	0	7,8±0,2	0	0	7,6±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	0	0	0	8,7±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	0	0	0	8,8±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	8,0±0,1	0	7,6±0,1	12,3±0,3	0
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	8,2±0,1	0	8,8±0,1	12,2±0,3	0
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	8,3±0,1	0	9,3±0,1	17,4±0,4	0

Таблица 5 – Антагонистическая активность водных экстрактов, полученных методом горячей экстракции, штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении условно патогенных и патогенных микроорганизмов

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)					
	*Staphylococcus aureus*6538-P	*Bacillus coagulans* 429	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Listeria monocytogenes* 766	*Escherichia coli* M 17	*Candida albicans*
Trametes spp. B 08/06	0	0	0	10,0±0,2	14,3±0,1	0
Trametes spp. 03/99	0	0	0	9,8±0,2	10,2±0,2	0
Trametes spp. 12/91	0	0	0	9,6±0,2	9,8±0,1	0
Trametes spp. 11/05	0	0	0	9,5±0,1	9,9±0,1	0
Trametes spp. 01/06	0	0	0	9,1±0,2	9,6±0,2	0
Trametes spp. 02/06	0	0	0	9,1±0,2	9,6±0,2	0
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	0	0	0	0	8,8±0,1	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	0	0	0	0	8,5±0,1	7,8±0,1
Fomitopsi spp. s Tyv-6/shag-3	0	0	0	0	8,5±0,1	9,2±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	0	0	0	0	10,2±0,2	9,2±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	0	7,3±0,1	0	0	11,0±0,2	9,6±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-2006	0	7,4±0,1	0	0	11,3±0,2	10,3±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	0	0	0	0	8,6±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	7,6±0,1	0	0	8,6±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	7,4±0,1	9,0±0,1	0	9,8±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	7,3±0,1	8,8±0,1	0	10,2±0,3	0
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	7,3±0,1	9,8±0,1	0	11,3±0,3	0
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	10,5±0,2	10,2±0,2	0	18,4±0,4	±0

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Противоплесневая активность штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes*

Таблица 1 – Антагонистическая активность спиртовых экстрактов штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении микромицетов рода *Penicillium*

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)				
	F-4481	F-4484	F-4486	F-4492	F-4497
Trametes spp. B 08/06	8,6±0,1	7,6±0,1	13,0±0,2	7,6±0,1	7,6±0,1
Trametes spp. 03/99	7,8±0,1	0	9,8±0,2	7,2±0,1	0
Trametes spp. 12/91	7,8±0,1	0	9,9±0,2	0	0
Trametes spp. 11/05	7,3±0,1	7,2±0,1	7,6±0,1	0	0
Trametes spp. 01/06	8,2±0,2	7,3±0,1	7,9±0,1	7,3±0,1	7,3±0,1
Trametes spp. 02/06	8,3±0,2	7,5±0,1	7,8±0,1	7,4±0,1	7,2±0,1
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	8,8±0,2	0	7,9±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	8,8±0,2	0	7,8±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	9,6±0,3	7,3±0,1	7,5±0,1	0	8,8±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	8,2±0,2	7,3±0,1	7,5±0,1	0	8,7±0,1
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	9,9±0,3	7,4±0,1	10,3±0,2	0	8,9±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-2006	11,3±0,3	7,5±0,1	12,0±0,2	7,0±0,1	10,0±0,2
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	±	9,3±0,2	7,6±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	0	8,8±0,2	8,2±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	0	8,2±0,2	8,3±0,1	0
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	7,6±0,1	9,2±0,2	9,9±0,2	7,0±0,1
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	7,6±0,1	9,3±0,1	10,0±0,2	0
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	10,0±0,2	9,6±0,1	10,0±0,2	7,3±0,1

Таблица 2 – Антагонистическая активность водных экстрактов, полученных методом исчерпывающей экстракции,штаммов родов *Fomitopsis* и *Trametes* в отношении микромицетов рода *Penicillium*

Штаммы	Зоны угнетения роста (мм)				
	F-4481	F-4484	F-4486	F-4492	F-4497
Trametes spp. В 08/06	9,0±0,1	0	8,3±0,1	0	0
Trametes spp. 03/99	7,8±0,1	0	7,9±0,1	0	0
Trametes spp. 12/91	7,7±0,1	0	7,6±0,1	0	0
Trametes spp. 11/05	7,6±0,1	0	0	0	0
Trametes spp. 01/06	8,8±0,2	0	8,2±0,2	0	0
Trametes spp. 02/06	8,6±0,2	0	8,1±0,2	0	0
Fomitopsis spp. Tyv2006/bal-2	0	7,0±0,1	0	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-5	0	7,2±0,1	0	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/shag-3	0	7,9±0,1	7,6±0,2	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-4	0	0	7,1±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-6/bal-11	0	8,0±0,1	7,2±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-2006	0	8,0±0,1	7,3±0,1	0	0
Fomitopsis spp. Tyv-5/shag-4	0	7,5±0,1	0	0	0
Fomitopsis spp. Fp-02/02	0	7,6±0,1	7,2±0,1	0	7,0±0,1
Fomitopsis spp. Fp-01/02	0	8,0±0,2	7,5±0,1	0	7,0±0,1
Fomitopsis spp. Fp-02/06	0	8,0±0,2	7,8±0,1	7,0±0,1	7,8±0,1
Fomitopsis spp. Fp-04/06	0	10,1±0,2	7,9±0,2	7,0±0,1	7,8±0,1
Fomitopsis spp. Fp-04/99	0	10,3±0,3	8,6±0,2	7,0±0,1	9,0±0,2

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Показатели роста штаммов *Fomitopsis spp. Tyv-2006, Fomitopsis spp.* Fp-04/99 *и Trametes spp.* В 08/06на питательных средах и растительных сусбтратах

Таблица 1 - Динамика роста штамма *Fomitopsis spp.* Tyv-2006 на различных питательных средах

Среда	Диаметр колонии, мм				
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.	35 сут.
Грибной агар	15,0±0,0	18,6±0,3	25,8±0,8	32,2±0,6	42,6±0,6
Капустный агар №1	16,4±0,3	20,3±0,8	26,8±0,5	33,6±0,3	45,8±0,8
Капустный агар №2	17,2±0,5	30,6±0,6	45,6±0,6	67,4±0,5	82,5±0,3
Картофельно-декстрозный агар	17,0±0,8	29,4±0,9	42,9±0,6	63,2±0,5	77,8±0,8
Картофельный агар	15,0±0,0	24,8±0,7	36,6±0,6	46,6±0,9	56,6±0,5
Мальт-дрожжевой агар	16,2±0,5	22,4±0,6	30,4±0,7	42,5±0,6	50,6±0,6
Морковный агар	15,0±0,0	16,8±1,0	29,8±0,7	45,3±0,5	60,8±0,9
Овсяный агар	15,0±0,0	24,4±0,7	30,6±0,7	38,4±0,9	46,3±0,5
Среда с гороховой мукой	16,8±0,3	25,2±0,3	32,6±0,4	39,2±0,7	48,5±0,3
Среда Сабуро	15,0±0,0	22,6±0,5	28,5±0,3	36,4±0,5	42,6±0,6
Среда Чапека	15,0±0,0	23,8±0,7	33,2±0,9	49,4±1,5	65,4±0,8
Maltax-10 с добавлением 1% лиственничных опилок	24,8±0,5	38,6±0,5	54,0±0,4	63,8±1,0	72,2±0,5
Maltax-10с добавлением 3% лиственничных опилок	26,0±0,8	37,8±0,6	51,8±0,7	65,0±0,9	74,0±0,6
Maltax-10 с добавлением 5% лиственничных опилок	21,0±0,9	32,8±0,7	48,4±0,8	61,5±0,7	75,2±0,5
Maltax-10 с молочной сывороткой	15,0±0,0	29,4±0,5	37,2±0,6	42,5±0,7	52,6±0,8

Таблица 2 - Динамика роста штамма *Fomitopsis spp.* Fp-04/99 на различных питательных средах

Среда	Диаметр колонии, мм				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
Грибной агар	15,0±0,0	23,4±0,3	30,1±0,8	38,4±0,7	45,6±0,8
Капустный агар №1	18,4±0,6	34,2±0,8	49,4±0,6	56,6±0,8	69,7±0,5
Капустный агар №2	20,4±0,5	39,8±0,9	52,4±0,7	61,6±0,9	74,3±0,8
Картофельно-декстрозный агар	19,4±0,6	54,2±1,3	78,8±0,8	89,6±0,1	90,0±0,0
Картофельный агар	20,0±0,1	57,6±1,4	77,8±1,4	90,0±0,0	90,0±0,0
Мальт-дрожжевой агар	15,0±0,0	28,4±0,3	36,5±0,8	52,4±0,5	68,8±0,6
Морковный агар	20,6±0,6	54,2±1,3	66,0±0,6	80,6±0,7	90,0±0,0
Овсяный агар	32,8±0,2	55,2±0,5	68,4±0,5	84,6±0,7	90,0±0,0
Среда с гороховой мукой	15,0±0,0	15,0±0,0	19,0±0,4	34,5±0,5	51,6±1,4
Среда Сабуро	15,0±0,0	18,8±0,8	27,6±0,8	29,6±0,3	32,8±0,3
Среда Чапека	31,4±0,3	42,6±0,6	58,6±0,4	63,0±1,7	79,8±0,7
Maltax-10с добавлением 1% лиственничных опилок	15,0±0,0	45,4±0,4	59,6±0,7	79,2±0,5	89,6±0,1
Maltax-10 с добавлением 3% лиственничных опилок	15,0±0,0	40,6±0,3	55,2±1,1	70,4±0,6	89,6±0,1
Maltax-10с добавлением 5% лиственничных опилок	29,6±0,8	46,4±1,2	70,2±0,7	83,4±0,7	89,6±0,1
Maltax-10с молочной сывороткой	23,4±0,3	39,8±0,6	55,6±0,6	63,5±0,8	69,4±0,7

Таблица 3 - Динамика роста штамма *Trametes spp.* В 08/06 на различных питательных средах

Среда	Диаметр колонии, мм			
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.
Грибной агар	42,8±1,1	53,2±1,1	60,6±0,8	70,0±0,0
Капустный агар №1	25,2±0,7	37,6±0,6	55,2±0,8	60,2±0,7
Капустный агар №2	34,3±0,3	42,8±0,5	58,3±0,2	65,7±0,2
Картофельно-декстрозный агар	38,6±1,6	78,5±0,8	89,8±0,3	90,0±0,0
Картофельный агар	44,4±0,9	79,6±0,6	89,6±0,1	90,0±0,0
Мальт-дрожжевой агар	44,4±1,3	63,4±0,6	76,4±1,3	84,6±0,3
Морковный агар	40,0±0,6	77,9±0,6	89,6±0,1	90,0±0,0
Овсяный агар	38,8±0,5	79,0±1,4	87,0±0,8	90,0±0,0
Среда с гороховой мукой	39,4±0,9	64,8±1,0	84,8±1,3	90,0±0,0
Среда Сабуро	45,8±0,5	79,8±0,7	89,6±0,1	90,0±0,0
Среда Чапека	22,8±1,0	50,2±1,8	80,6±0,7	89,6±0,1
Maltax-10 с добавлением 1% лиственничных опилок	31,2±0,7	73,6±1,2	89,4±0,6	90,0±0,0
Maltax-10 с добавлением 3% лиственничных опилок	30,8±1,1	79,0±0,6	89,4±0,9	90,0±0,0
Maltax-10 с добавлением 5% лиственничных опилок	48,0±0,8	79,8±1,1	90,0±0,0	90,0±0,0
Maltax-10 с молочной сывороткой	38,2±0,7	52,0±0,8	63,6±0,3	75,2±0,5

Таблица 4 - Динамика роста штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 на различных твердых растительных субстратах

Субстрат	Диаметр колонии, мм				
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.	35 сут.
Опилки лиственничных пород	21,0±0,8	28,0±1,2	35,4±0,9	43,0±0,7	49,4±1,1
Опилки лиственничных пород и ржаные отруби (1:1)	28,8±0,8	41,2±0,8	49,4±0,6	66,0±0,6	82,8±0,3
Опилки лиственничных пород и кукурузная мука (2:1)	22,8±0,5	33,8±1,1	40,0±0,9	47,6±1,1	54,8±0,7
Пшено	31,0±0,9	46,8±0,7	57,8±0,8	74,0±0,8	83,2±0,7
Солома	15,6±0,4	19,2±0,3	22,6±0,3	27,6±0,6	30,8±0,5
Солома и лузга подсолнечника (1:1)	16,4±0,3	22,0±0,8	31,6±0,7	44,2±0,5	51,2±0,7
Лузга подсолнечника и кукурузная мука (1:1)	18,2±0,5	23,6±0,3	36,4±0,3	47,4±0,6	50,4±0,6

Таблица 5 - Динамика роста штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 на различных твердых растительных субстратах

Субстрат	Диаметр колонии, мм				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
Опилки лиственничных пород	15,0±0,0	24,4±0,8	33,4±0,9	34,4±0,7	37,0±1,1
Опилки лиственничных пород и ржаные отруби (1:1)	25,0±0,9	29,6±0,3	46,6±1,0	51,4±0,3	65,0±0,9
Опилки лиственничных пород и кукурузная мука (2:1)	17,6±1,0	23,2±0,7	49,4±0,6	65,0±0,4	74,3±0,8
Пшено	21,4±0,6	31,8±0,3	43,6±0,7	66,4±0,6	81,2±0,5
Солома	23,4±0,6	34,6±0,3	40,8±0,3	51,2±0,8	60,8±0,6
Солома и лузга подсолнечника (1:1)	24,6±0,8	33,4±0,6	41,0±0,6	49,2±0,5	57,4±0,5
Лузга подсолнечника и кукурузная мука (1:1)	15,8±0,3	18,8±0,5	21,2±0,7	24,2±0,3	26,6±0,6

Таблица 6 - Динамика роста штамма *Trametes versicolor* В 08/06 на различных твердых растительных субстратах

Субстрат	Диаметр колонии, мм			
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.
Опилки лиственничных пород	31,6±0,6	40,8±1,0	45,0±1,2	50,0±0,8
Опилки лиственничных пород и ржаные отруби (1:1)	38,2±0,9	57,6±1,0	88,8±1,1	90,0±0,0
Опилки лиственничных пород и кукурузная мука (2:1)	36,2±0,7	52,8±1,1	87,2±1,0	90,0±0,0
Пшено	38,6±1,6	75,6±0,3	90,0±0,0	90,0±0,0
Солома	56,2±0,3	76,6±0,9	90,0±0,0	90,0±0,0
Солома и лузга подсолнечника (1:1)	56,8±0,7	74,8±0,7	90,0±0,0	90,0±0,0
Лузга подсолнечника и кукурузная мука (1:1)	15,0±0,0	17,8±0,4	23,0±0,6	29,4±0,6

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Динамика накопления биомассы мицелия штаммов *Fomitopsis officinalis Tyv-2006, Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 *и Trametes versicolor* B 08/06

Таблица 1 - Динамика накопления биомассы мицелия штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 *и Trametes versicolor* B 08/06 при статическом жидкофазном культивировании на среде Maltax-10

Время культивирования, сут	Сухая биомасса, г		
	Fomitopsis officinalis Tyv-2006	*Fomitopsis pinicola* Fp-04/99	*Trametes versicolor*B 08/06
7	0,52±0,02	0,86±0,01	1,04±0,01
10	1,03±0,05	1,08±0,01	1,31±0,02
14	1,61±0,02	1,32±0,02	1,99±0,05
21	2,04±0,03	2,05±0,03	3,08±0,07
28	2,47±0,03	2,72±0,03	4,72±0,07
35	2,94±0,02	3,11±0,04	4,79±0,02
42	3,01±0,02	3,19±0,05	4,81±0,01

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Влияние оптических излучений на показатели роста штаммов *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006, *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 *и Trametes versicolor* B 08/06

Таблица 1 - Действие когерентного света различных экспозиционных доз на динамику роста штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006

Экспозиционная доза, Дж	Диаметр колонии, мм			
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.
1,8×1	21,2±0,5	42,4±0,6	76,0±0,6	86,2±0,5
1,8×2	21,2±0,7	43,4±0,8	79,8±0,5	90,0±0,0
1,8×3	21,6±0,6	42,6±0,3	83,2±0,5	90,0±0,0
0,36×1	22,0±0,4	39,6±0,7	72,0±0,8	83,0±0,6
0,36×2	22,2±0,8	38,4±0,6	75,6±0,6	83,2±0,3
0,36×3	21,8±0,8	43,0±0,8	76,4±0,4	86,8±0,5
контроль	19,0±0,8	37,2±0,8	55,6±0,6	70,6±0,6

Таблица 2 - Действие когерентного света различных экспозиционных доз на динамику роста штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99

Экспозиционная доза	Диаметр колонии, мм				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
1,8×1	16,6±0,3	51,8±0,8	64,4±0,8	81,0±0,9	89,4±0,6
1,8×2	16,8±0,3	55,6±0,9	71,8±0,8	90,0±0,0	90,0±0,0
1,8×3	16,6±0,8	57,8±0,8	67,6±1,0	89,4±0,6	90,0±0,0
0,36×1	16,8±0,5	54,6±0,6	67,6±0,8	88,8±1,0	90,0±0,0
0,36×2	16,6±0,6	53,0±0,4	65,4±1,1	90,0±0,0	90,0±0,0
0,36×3	16,0±0,0	55,4±0,6	65,0±1,2	88,2±1,0	90,0±0,0
контроль	15,2±0,3	48,8±0,8	62,6±1,2	81,4±1,2	87,2±1,0

Таблица 3 - Действие когерентного света различных экспозиционных доз на динамику роста штамма *Trametes versicolor* В 08/06

Экспозиционная доза	Диаметр колонии, мм			
	2 сут.	3 сут.	4 сут.	5 сут.
1,8×1	42±1,1	66,2±1,2	88,6±0,9	90,0±0,0
1,8×2	40,2±1,1	68,6±0,7	88,6±0,8	90,0±0,0
1,8×3	39,4±0,8	66,0±0,6	90,0±0,0	90,0±0,0
0,36×1	38,2±0,8	63,4±0,9	83,8±0,7	90,0±0,0
0,36×2	38,6±0,7	66,0±0,8	86,8±1,0	90,0±0,0
0,36×3	38,8±1,0	67,8±0,7	85,6±0,8	90,0±0,0
контроль	36,8±0,8	58,8±1,0	70,4±0,6	79,2±0,5

Таблица 4 - Действие некогерентного света с различными длиннами волн на динамику роста штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006

Длина волны λ, нм	Диаметр колонии, мм			
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.
400	20,6±0,8	47,2±0,8	85,2±0,8	90,0±0,0
461	22,2±0,7	48,6±0,6	82,8±1,1	90,0±0,0
467	22,8±0,9	46,2±0,7	83,6±0,9	90,0±0,0
496	22,6±0,3	45,2±0,8	84,2±0,3	90,0±0,0
518	21,4±0,6	41,0±0,9	79,0±0,9	84,6±0,6
578	22,6±0,9	41,6±0,8	78,0±0,9	85,8±0,8
контроль	19,0±0,8	37,2±0,8	55,6±0,6	70,6±0,6

Таблица 5 - Действие некогерентного света с различными длиннами волн на динамику роста штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99

Длина волны λ, нм	Диаметр колонии, мм				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
400	18,6±0,8	50,8±1,1	61,0±0,8	82,2±1,0	89,8±0,3
461	19,4±0,8	54,2±0,7	64,4±0,7	85,6±0,8	90,0±0,0
467	19,8±0,3	51,4±0,6	61,2±1,1	82,2±0,7	89,8±0,3
496	17,4±0,6	49,8±0,8	61,8±1,0	81,6±0,6	89,6±0,1
518	21,4±0,6	53,4±0,7	66,4±0,6	86,4±0,8	90,0±0,0
578	20,4±1,0	55,0±0,9	62,8±1,1	83,4±1,2	90,0±0,0
контроль	15,2±0,3	48,8±0,8	62,6±1,2	81,4±1,2	87,2±1,0

Таблица 6 - Действие некогерентного света с различными длиннами волн на динамику роста штамма *Trametes versicolor* B 08/06

Длина волны λ, нм	Диаметр колонии, мм			
	2 сут.	3 сут.	4 сут.	5 сут.
400	44,6±0,8	61,6±0,6	87,2±0,8	90,0±0,0
461	44,6±1,0	63,4±0,9	89,2±1,1	90,0±0,0
467	43,2±1,0	59,6±0,8	85,6±0,3	90,0±0,0
496	46,4±0,8	68,4±0,6	86,6±0,3	90,0±0,0
518	47,2±0,5	68,8±0,5	86,4±0,8	90,0±0,0
578	44,8±0,7	66,0±0,6	86,2±0,3	90,0±0,0
контроль	36,8±0,8	58,8±1,0	70,4±0,6	79,2±0,5

Таблица 7 - Действие лазера экспозиционной дозой 0,36 Дж на динамику накопления биомассы мицелия штаммов при статическом жидкофазном культивировании на среде Maltax-10

Время культивирования, сут	Сухая биомасса, г		
	Fomitopsis officinalis Tyv-2006	*Fomitopsis pinicola* Fp-04/99	*Trametes versicolor*B 08/06
7	0,55±0,06	0,99±0,03	1,18±0,03
10	1,14±0,06	1,18±0,03	1,43±0,05
14	1,78±0,01	1,46±0,04	2,26±0,07
21	2,22±0,02	2,24±0,04	3,78±0,02
28	2,69±0,03	2,96±0,05	5,23±0,02
35	3,16±0,05	3,39±0,05	5,36±0,01
42	3,21±0,07	3,41±0,07	5,37±0,05

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Влияние акустических волн на показатели роста штаммов *Fomitopsis officinalis Tyv-2006, Fomitopsis pinicola* Fp-04/99 *и Trametes versicolor* B 08/06

Таблица 1 - Действие акустических волн в слышимом диапазоне частот на динамику роста штамма *Fomitopsis officinalis* Tyv-200*6*

Частота, Гц	Диаметр колонии, мм			
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.
200	22,2±0,5	39,4±0,7	71,8±0,6	82,9±0,3
1000	21,1±0,3	41,2±0,2	75,8±0,4	85,8±0,4
2000	21,5±0,3	42,3±0,7	83,2±0,4	88,8±0,2
контроль	19,0±0,8	37,2±0,8	55,6±0,6	70,6±0,6

Таблица 2 - Действие акустических волн в слышимом диапазоне частот на динамику роста штамма *Fomitopsis pinicola* Fp-04/99

Частота, Гц	Диаметр колонии, мм				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
200	16,5±0,5	52,0±0,3	65,2±0,8	88,8±0,8	90,0±0,0
1000	16,2±0,0	55,2±0,6	64,9±0,2	88,2±0,8	90,0±0,0
2000	16,6±0,3	55,5±0,7	71,4±0,8	90,0±0,0	90,0±0,0
контроль	15,2±0,3	48,8±0,8	62,6±1,2	81,4±1,2	87,2±1,0

Таблица 3 - Действие акустических волн в слышимом диапазоне частот на динамику роста штамма *Trametes versicolor* B 08/06

Частота, Гц	Диаметр колонии, мм			
	2 сут.	3 сут.	4 сут.	5 сут.
200	38,1±0,5	62,3±0,3	83,6±0,3	90,0±0,0
1000	38,6±0,8	67,0±0,7	85,6±0,2	90,0±0,0
2000	38,4±0,3	65,3±0,7	86,4±0,8	90,0±0,0
контроль	36,8±0,8	58,8±1,0	70,4±0,6	79,2±0,5

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Лабораторный регламент

Лабораторный регламент на производство противомикробного препарата «Микотрам»

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий лабораторный регламент распространяется на противомикробный препарат «Микотрам» на основе штамма *Trametes versicolor* В 08/06 (ВКПМ F-1024) предназначенный для использования в мясоперерабатывающей промышленности. Обозначение в документе при заказе: Противоплесневый препарат «Микотрам» для мясоперерабатывающей промышленности.

1.1 Характеристика препарата

Назначение и действие препарата:

Микотрам – препарат грибного происхождения для удлинения сроков хранения и защиты мясной продукции от биологических контаминантов. В пищевой промышленности используется в качестве добавки при производстве продукции: обладает противомикробными свойствами, снижает степень окисления липидов. Действующая основа препарата – биомасса мицелия штамма-антагониста ограничивает рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также возбудителей плесневения за счет продуцируемых ферментов и биологически активных веществ.

Основные характеристики:

Действующее вещество – мицелиальная масса на основе штамма *Trametes versicolor* В 08/06 (ВКПМ F-1024).

Препаративная форма: воздушно-сухой порошок бежевого цвета, полученный путем жидкофазного статического культивирования на среде Maltax 10.

Дозировка: предварительно гидратированный препарат вносится в фарш на стадии куттерования из расчета не более 20 г на 1000 г сырья.

Токсичность: препарат относится к неопасным соединениям для людей.

Меры предосторожности: при работе с препаратом использовать перчатки. Во время работы нельзя пить, курить, принимать пищу. После работы вымыть лицо и руки с мылом, прополоскать рот. При попадании препарата на кожу или в глаза – смыть большим количеством воды.

Срок хранения: препарат сохраняет свойства в цельной упаковке не более 1 года (при температуре от -5ºС до +5ºС), при влажности не выше 50 %.

Характеристика продуцента: штамм В 08/06 вид *Trametes versicolor* Lloyd ВКПМ F-1024, выделенный из плодового тела в 2006 г.

1.2 Субстраты и материалы

Для производства препарата субстратом служит среда Maltax 10: Maltax 10 (не охмеленный солодовый экстракт) – 50 г; вода – 1000 мл. Химический состав Maltax-10 представлен в таблице 1 (содержание сухих веществ не менее 80 %).

Таблица 1 – Химический состав Maltax 10, % от а. с. в.

Наименование показателей	Maltax-10
Редуцирующие сахара	65
Белки	5,0-8,0
Жиры	менее 0,12

Таблица 2 – Динамика накопления биомассы штаммом при статическом жидкофазном культивировании *Trametes versicolor* В 08/06 на среде Maltax-10

Время культивирования, сут.	Выход сухой биомассы, г/л
7	1,04
10	1,31
14	1,99
21	3,08
28	4,72

1.3 Технология и экономические затраты на производство препарата в лабораторных условиях

Разработанная технология получения препарата Микотрам на основе штамма *Trametes versicolor* В 08/06 при выращивании на среде Maltax-10, включающей следующие этапы (рисунок 1):

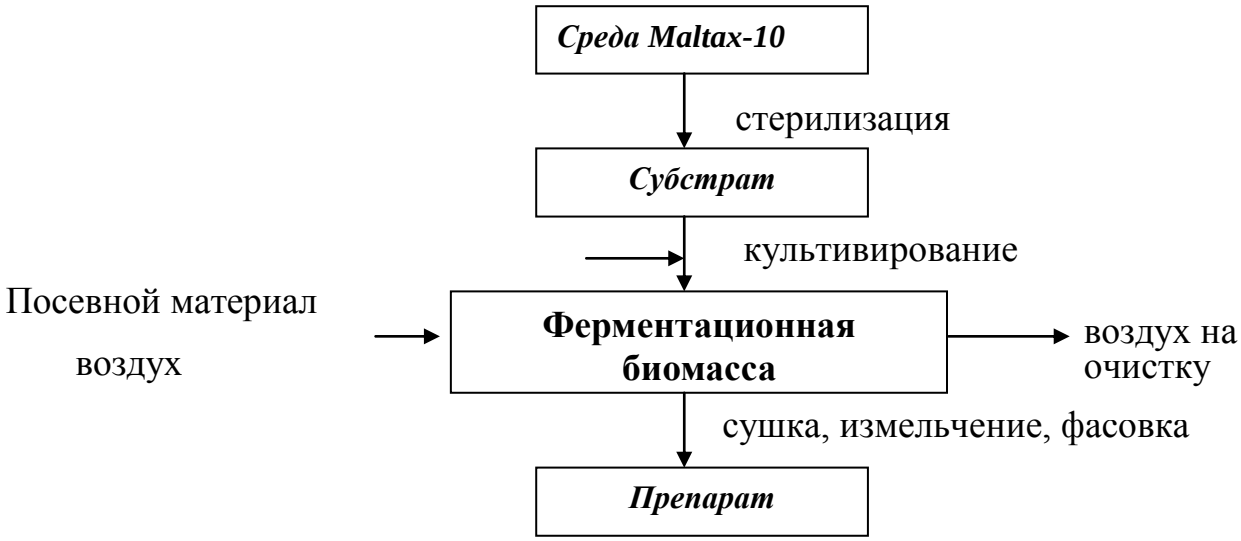


Рисунок 1 – Технологическая схема получения препарата в лабораторных условиях

1. Приготовление посевного материала. Выращивание штамма *Trametes versicolor* В 08/06 проводили на агаризованной среде Maltax10 (г/л): Maltax 10 (не охмеленный солодовый экстракт) – 50; агар микробиологический – 20 при температуре 28-30ºС в течение 5 суток;

2. Приготовление субстрата. Готовили жидкую среду Maltax 10 (г/л): Maltax 10 (не охмеленный солодовый экстракт) – 50, после чего стерилизовали в автоклаве при температуре 121ºС и атмосферном давлении 1 атм. в течение 30 минут;

3. Инокулирование субстрата. Охлажденную жидкую среду разливали в стерильных условиях в металлические поддоны и засевали блоками агара с посевным материалом штамма *Trametes versicolor* В 08/06;

4. Жидкофазная ферментация. Культивирование засеянного субстрата проводили при pH 6.5, температуре 25-27ºС в течение 21 суток;

5. Высушивание и измельчение препарата проводили в стерильных условиях при комнатной температуре. Фасовку проводили по 5 кг в полиэтиленовые пакеты.

В таблице 3 приведены текущие затраты для получения готового препарата.

Таблица 3 – Текущие затраты на получение препарата на основе мицелия *Trametes versicolor* В 08/06

Наименование	Количество на 500 кг продукта, т	Суммарная стоимость, тыс. руб
Maltax-10	5,0	250,0
Вода	100,0	2,7
Электроэнергия, кВт*ч	100,0	400,0
	Всего	652,7

2 ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

2.1 Препарат должен выпускаться в соответствии с требованиями настоящих условий и изготавливаться с соблюдением действующих санитарных норм и по технологической инструкции, утвержденной в установленном порядке.

2.2 Препарат должен соответствовать характеристикам, указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика препарата «Микотрам»

Наименование показателя	Характеристика биопрепарата
Внешний вид	Воздушно-сухой порошок
Запах	Без запаха
Цвет	Бежевого цвета

2.3 По микробиологическим показателям биопрепарат должен соответствовать условиям, указанным в таблице 5.

Таблица 5 – Микробиологические показатели препарата «Микотрам»

Наименование показателя	Характеристика и норма препарата
Клетки в микроскопическом препарате	Фрагменты мицелия
Бактерии группы кишечных палочек	Не допускаются в 1,0 г
Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы	Не допускаются в 10,0 г

2.4 При производстве биопрепарата должно применяться следующие материалы:

- стандартный солодовый светлый экстракт Maltax-10;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

2.5 Упаковка и маркировка

2.5.1 Препарат расфасовывают в асептических условиях в полиэтиленовые пакеты, вместимостью 3-5 литров. Допускается использование других упаковочных материалов отечественного или импортного производства, разрешенных органами Роспотребнадзора;

2.5.2 Упаковочный материал перед упаковыванием препарата предварительно подвергается дезинфекции спиртом (или ультрафиолетовыми лучами в течение 15±2 секунд).

2.5.3 На каждую упаковочную единицу наносят маркировку при помощи трафарета или наклеивают этикетку с указанием: наименование предприятия-изготовителя, адрес; наименование биопрепарата; номер партии; масса нетто; дата изготовления; срок годности; условия хранения; обозначение настоящих

технических условий; информация о сертификации.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

3.1 Производство препарата и контроль качества должны осуществляться с соблюдением требований биологической безопасности по ГОСТ 12.1.008 и общих требований безопасности по ГОСТ 12.2.003 и 12.3.033. Производственное оборудование в процессе его эксплуатации должно обеспечивать соблюдение условий труда в соответствии с установленными нормативными документами.

3.2 Рабочее помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, микробиологический бокс должен быть оборудован ламинаром.

3.3 Технологический процесс должен соответствовать «Санитарным правилам для производства ферментов, биопрепаратов» N 945а-71 от 27.12.71.

4 ПРИЕМКА

4.1 Препарат выпускается партиями. Под партией понимают любое количество препарата, выработанное из одного и того же сырья в течение одного технологического цикла.

4.2 Каждая партия продукта должна быть проверена на соответствие требованиям технологических условий и оформлена удостоверением о качестве и безопасности, в котором указываются:

- наименование предприятия-изготовителя;
- наименование продукта и обозначение настоящих технических условий;
- номер партии;
- объем партии;
- данные лабораторных исследований;
- дата изготовления;

- дата выдачи документа о качестве;
- должность и подпись лица, ответственного за выпуск продукции.

Микробиологические показатели определяют в каждой партии продукции.

4.3 Физико-химические показатели определяют периодически, но не реже 1 раза в 3 месяца.

5 МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

5.1 Определение внешнего вида и цвета препарата проводят визуально.

5.2 Аппаратура, материалы и реактивы:

- весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104;
- скальпели и ножницы по ГОСТ 21240;
- пинцеты по ГОСТ 21241;
- pH-метр или другой прибор для определения pH среды в интервале 1-14 с погрешностью не более 0.1 ед. pH;
- автоклав вертикальный или горизонтальный по ГОСТ Р МЭК 61 0 1 0-2-041 ;
- микроскопы марок МБИ и МБР по ГОСТ 28489;
- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 16317;
- термостат любого типа, обеспечивающий температуру нагрева от 20 до 100ºС;
- спиртовка лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336;
- баня водяная любого типа, обеспечивающая температуру нагрева от 20 до 100ºС;
- электроплитка электрическая по ГОСТ 14919;
- пипетки градуированные по гост 29227;
- колбы П (Кн-I-60, 100, 250, 500, 1000, 2000 - 29/32) по ГОСТ 25336;
- стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
- пробирки П 1-16-160 ХС по ГОСТ 25336;

- чашки ЧБН-3-100 по ГОСТ 25336;

- воронки В-I00-150(200) по ГОСТ 9147;

- ступка фарфоровая по ГОСТ 9147;

- штативы для пробирок ПО ТУ 64-1-2669;

- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 9412;

- марля медицинская по ГОСТ 9412;

- масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739;

- среда Мальтэкстракт агар фирмы-изготовителя «Hi-media», Индия;

- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;

5.3 Для контроля отнесения природных штаммов к видовой принадлежности рекомендуется анализ фенол/хлороформным методом, ПЦР-анализ (168 гик). При секвенировании вариабельных участков 168 rDNA должны получить следующую нуклеотидную последовательность для штамма *Trametes versicolor* В 08/06*:*

ACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTG
TGCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTAT
ACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAAC
TTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTAAT
TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTT
GTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGTTGGTCGGCTCCTCTTGAA
TGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGAC
CGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTTAACATCTGACC
TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

5.4 Определение антибиотической активности *Trametes versicolor* В 08/06 в отношении условно-патогенных микроорганизмов проводят методом дисков. Тест-культуры (*Staphylococcus, Bacillus, Escherichia, Listeria, Candida, Penicillium)* высевают сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашки Петри в 3-х повторностях. Бумажные диски смачивали водными

экстрактами и раскладывали в чашки Петри. Учет результатов проводили путем измерения диаметра зон подавления роста тест-культуры микроорганизмов миллиметровой линейкой. Полученные результаты интерпретировали следующим образом: « - » – активности нет; до 12 мм – слабая чувствительность; от 13 до 29 мм – средняя чувствительность; 30 мм и более – высокая чувствительность [Егоров, 2004].

Для сравнительной оценки активности штаммов используют коэффициент активности, который рассчитывают по формуле (1):

$$K_a = \frac{A}{K}, \quad (1)$$

где $К_а$ – коэффициент противомикробной активности гриба, мм; А – сумма диаметров зон подавления тест-объектов, мм; К – количество тест-объектов.

6 ХРАНЕНИЕ

Препарат сохраняет свойства в цельной упаковке не более 1 года (при температуре от -5ºС до +5ºС), при влажности не выше 50 %.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

Акт дегустации

ДЕГУСТАЦИОННЫЙ АКТ

Комиссия в составе:

проф. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», д.т.н. Бобреневой И.В., доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Абдрашитовой Г.Г., доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Шалимовой Т.А., доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Бухтеевой Ю.М., заведующего кафедрой «Химия пищи и пищевая биотехнология» проф. д.т.н. Жаринова А.И., проф. кафедры «Химия пищи и пищевая биотехнология» д.б.н. Громовых Т.И., зав. «ПНИЛЭФМОПП» к.х.н. Данильчук Т.Н., аспиранта Бирюкова Е.Г., аспирантки Жилинской Н.В. составила настоящий акт о том, что в МГУПП 4 июня 2013 года была проведена дегустация образцов ливерных колбас с использованием пищевой добавки на основе мицелия *Trametes versicolor*. Дегустационная комиссия оценивала внешний вид, консистенцию, сочность, аромат, вкус и цвет и ливерных колбас по 5-ти бальной системе. Результаты органолептической оценки отражены в таблице 1.

Таблица 1

Органолептические показатели готового продукта

Образец	Показатели качества по 5 –бальной шкале						
	внешний вид	консистенция	сочность	аромат	вкус	цвет	средний бал
контроль	4,2	4,3	4,4	4,7	4,7	4,6	4,5
опытный	4,4	4,8	4,4	4,8	4,9	4,8	4,7

Анализ результатов органолептических свойств показал, что опытный образец получил более высокую оценку. Выявлено, что мицелий усиливает вкусовые свойства продукта. Вкус контроля более пресный. Консистенция в контрольном образце жесткая, крошливая, в опытном - нежная, мазеобразная. Цвет в контроле темнее, чем в опытном образце. Аромат у обоих образцов свойственен данному виду продукции. Поэтому можно сделать вывод, что использование мицелия *Trametes versicolor* в колбасных изделиях, в данном случае ливерной колбасы, позволяет улучшить органолептические свойства готового продукта.

Члены комиссии:

проф. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», д.т.н. Бобренева И.В.

доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Абдрашитова Г.Г.

доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Шалимова Т.А.

доц. кафедры «Технология мяса и мясных продуктов», к.т.н. Бухтеева Ю.М.

аспирант кафедры «Технология мяса и мясных продуктов» Бирюков Е.Г.

заведующий кафедрой «Химия пищи и пищевая биотехнология» проф. д.т.н. Жаринов А.И

проф. кафедры «Химия пищи и пищевая биотехнология» д.б.н. Громовых Т.И

аспирантка кафедры «Химия пищи и пищевая биотехнология» Жилинская Н.В.

зав. «ПНИЛЭФМОПП» к.х.н. Данильчук Т.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

Характеристики покрытий метилцеллюлозы с добавками на основе штамма *Trametes versicolor* В 08/06

Таблица 1 - Вязкость водных растворов метилцеллюлозы и водных растворов метилцеллюлозы с жизнеспособным мицелием штамма В 08/06 *Trametes versicolor*

Вид раствора	Вязкостьη, спз	Вид раствора	Вязкостьη, спз
Метилцеллюлоза 3 %	3617,6±37,8	Метилцеллюлоза 3% с «живым» мицелием *Trametes versicolor*	12,3±0,1
Метилцеллюлоза 4 %	13221,2±142,6	Метилцеллюлоза 4% с «живым» мицелием *Trametes versicolor*	21,6±0,4
Метилцеллюлоза 5 %	32405,8±76,2	Метилцеллюлоза 5% с «живым» мицелием *Trametes versicolor*	152,3±0,5

Таблица 2 - Определение прочности и относительного удлинения при растяжении образцов пленки на основе метилцеллюлозы

Вид пленки	Ширина образца, мм	Толщина образца, мм	Длина образца, мм	Максимальная нагрузка, Н	Удлинение, мм	Максимальная прочность МПа	Относительное удлинение, %
Метилцеллюлоза 3 %	10,0±0,0	6,0±0,2	51,0±0,4	56,1±2,4	6,87±0,8	961,9±6,8	13,5±0,8
Метилцеллюлоза 5% с «живым» мицелием *Trametes versicolor*	10,0±0,0	5,0±0,0	50,7±0,6	44,9±2,2	6,3±0,8	897,3±7,3	12,4±0,8

Таблица 3 - Показатели убыли массы пищевых продуктов

Образец	Убыль массы, %						
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.	12 сут.	14 сут.
Чернослив							
С покрытием	1,64	2,28	3,86	4,56	5,09	5,57	6,17
Без покрытия	2,04	2,41	3,27	3,89	4,19	4,69	5,33
Курага							
С покрытием	1,18	1,54	2,22	2,62	2,66	2,98	3,34
Без покрытия	1,07	1,34	1,97	2,14	2,39	2,52	3,07
Сырокопченая колбаса							
С покрытием	1,82	2,99	4,96	5,57	6,4	7,47	8,22
Без покрытия	3,62	3,73	4,72	5,02	5,47	5,99	6,37

Таблица 4 – Микробиологические характеристики смывов с поверхности исследуемых образцов сухофруктов после 3 месяцев хранения

Показатель	КМАФАнМ,КОЕ/г	БГКП, (не допускаются в 1,0 г Продукта)	Патогенные, в т.ч сальмонеллы и листерии (не допускаются в 25г продукта)	Плесневые грибы и дрожжи КОЕ/г
Курага				
С покрытием	$3*10^3$	Не обнаружены		$3,9*10^2$
Без покрытия	$5*10^3$	Обнаружены	Не обнаружены	$4,6*10^2$
Чернослив				
С покрытием	$2,8*10^3$	Не обнаружены		$3,6*10^2$
Без покрытия	$4,5*10^3$	Не обнаружены		$4,2*10^2$

Таблица 5 – Микробиологические характеристики смывов с поверхности исследуемых образцов сырокопченой колбасы после 3 месяцев хранения

Показатель	БГКП, (не допускаются в 1,0 г продукта)	*St. aureus* (не допускаются в 1,0 г продукта)	Патогенные, в т.ч сальмонеллы и листерии (не допускаются в 25г продукта)	Сульфидредуцирующие клостридии (не допускаются в 0,01г продукта)
С покрытием	Не обнаружены			
Без покрытия	Не обнаружены			