

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГРИБА *FOMES FOMENTARIUS*

Трошкова Г. П., Костина Н. Е., Проценко М. А., Скарнович М. А.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово Новосибирской обл., Россия (630559, р.п. Кольцово Новосибирской обл.), e-mail: troshkova@vector.nsc.ru

Статья посвящена разработке технологии получения сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius* с целью использования его для создания эффективных препаратов для профилактики и лечения вирусных инфекций. Описаны различные методы экстрагирования биологически активных веществ из лесного гриба *FOMES FOMENTARIUS* (перколяция, мацерация и дробная мацерация) с использованием в качестве экстрагентов воды и спирта этилового различной концентрации. Установлены оптимальные значения технологических параметров процесса получения сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius*. Максимальное содержание экстрактивных веществ ($5,6 \pm 0,7$) % выявлено в экстрактах, полученных с использованием спирта 70 % для частиц размером от 50 до 500 мкм при температуре процесса 55–60 °С. Проведен качественный и количественный анализ биологически активных веществ, содержащихся в сухом экстракте, установлено наличие разнообразных БАВ, таких как белки и полисахариды, сапонины тритерпеновой группы, кумарины, фенольные соединения. Выявлены ведущие группы БАВ для последующей стандартизации экстракта. Показано, что содержание белков в сухом экстракте из плодового тела гриба *Fomes fomentarius* находилось в пределах от 7,0 до 8,4 % , полисахаридов от 53,2 до 68,2 %.

Ключевые слова: *Fomes fomentarius*, сухой экстракт, биологически активные вещества.

OPTIMIZATION TECHNOLOGY OF THE PRODUCTION A DRY EXTRACT FROM MUSHROOM *FOMES FOMENTARIUS*

Troshkova G. P., Kostina N. E., Protsenko M. A., Skarnovich M. A.

The Federal Budget Institution of Science “The State Research Center of Virology and Biotechnology Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia (630559, Koltsovo, Novosibirsk region), e-mail: troshkova@vector.nsc.ru

The article is devoted to the development of technology for production of dry extract from the mushroom *Fomes fomentarius* for use it to create effective drugs for the prevention and treatment of viral infections. The various methods of biologically active substances extraction from the mushroom *FOMES FOMENTARIUS* (percolation, maceration and fractional maceration) using various concentrations ethyl alcohol of have been described. The optimal values of technological parameters of the process of obtaining a dry extract from the mushroom *Fomes fomentarius* has been determined. The maximum content of extractives ($5,6 \pm 0,7$) % found in the extracts, which were obtained using an alcohol solution with a concentration of 70%. (optimum temperature of the extraction process – 55–60 ° C, particles of mushroom ranging in size from 50 to 500 microns). The qualitative and quantitative analysis of biologically active substances contained in the dry extract has been performed, the presence of various biologically active substances such as proteins and polysaccharides, triterpene saponins, coumarins and phenolic compounds has been established. The leading group of biologically active compounds for further standardization of the extract has been revealed. It has been showed, that the protein content in the dried extract of the fruiting body of mushroom *Fomes fomentarius* ranged from 7.0 to 8.4% and polysaccharides from 53.2 to 68.2 %.

Keywords: *Fomes fomentarius*, dry extract of mushroom, biologically active components.

Введение

Разработка и поиск эффективных препаратов для профилактики и лечения вирусных инфекций является одной из актуальных задач современной фармацевтической промышленности. В связи с тем, что антибиотики малоэффективны при вирусных заболеваниях, потребность в новых средствах очень высока. В последние годы повысился

интерес к лекарственным средствам растительного происхождения. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» ведется поиск и разработка новых лекарственных препаратов, как на основе плодовых тел, так и культивируемого мицелия некоторых грибов. Так, предложен ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека первого типа, содержащий водный или водно-спиртовой экстракт природных биологически активных веществ из базидиального гриба *Inonotus obliquus* (патент РФ № 2375073). Показана высокая вируснейтрализующая активность в отношении вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) некоторых гастероидных грибов: *Lycoperdon perlatum* (дождевик жемчужный), *Dictyophora duplicata* (диктиофора сдвоенная), *Calvatia lilacina* (головач сиреневатый) и *Lycoperdon umbrinum* (дождевик умбровый) [1]. Высшие базидиомицеты, как источники различных БАВ, обладающих высокой фармакологической активностью, низкой токсичностью при практически полном отсутствии побочных эффектов, вызывают вполне логичный интерес у исследователей, разрабатывающих новые лекарственные средства. Ранее было показано, что трутовик настоящий – *Fomes fomentarius*, относящийся к семейству *Polyporaceae*, обладает широким спектром биологических активностей: противоопухолевой, иммуномодулирующей, антиоксидантной [6]. Полисахариды, выделенные из культивированного мицелия *Fomes fomentarius*, оказывают антипролиферативное воздействие *in vitro* на клетки рака желудка [4], а водный экстракт гриба нормализует уровень глюкозы в крови и липидный обмен, а также снижает активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, стимулирует тканевое дыхание. В Японии и Корее экстракт трутовика настоящего в сочетании с лекарственными растениями применяют в составе функциональных напитков для профилактики раковых заболеваний и диабета, для лечения нервных заболеваний и нормализации состава крови [5]. Однако наиболее перспективными для приготовления различных лекарственных форм могут стать сухие экстракты *Fomes fomentarius*. В связи с этим задачей настоящего исследования явилось изучение химического состава и разработка технологии приготовления сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили плодовые тела *Fomes fomentarius*, собранные в августе 2011 г. в Караканском бору на территории Ордынского района Новосибирской области. Плодовые тела высушивали до воздушно-сухого состояния, упаковывали в бумажные мешки и хранили в сухом прохладном месте. Собранный сырьё было использовано для проведения химических и технологических исследований.

Извлечение БАВ из плодовых тел гриба проводили различными методами: перколяцией, мацерацией и дробной мацерацией с использованием в качестве экстрагентов воды и спирта этилового различной концентрации.

Содержание БАВ в сырье определяли в пересчете на абсолютно сухое сырье. Определение суммы экстрактивных веществ проводили по методике ГФ XI изд., вып.2. Для качественного обнаружения флавоноидных соединений в экстрактах гриба применяли качественные реакции с раствором натрия гидроксида, алюминия хлорида, железа хлорида, а также метод ТСХ. Обнаружение кумаринов проводили с помощью лактонной пробы, основанной на способности лактонного кольца размыкаться при подщелачивании и замыкаться в кислой среде. Оценку наличия сапонинов проводили по реакции пенообразования. Количественное содержание белка в образцах определяли с помощью красителя кумассиG-250, по Бредфорд, с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [3]. Суммарное содержание полисахаридов определяли спектрофотометрически модифицированным антроновым методом Дрейвуда [2], включающим кислотный гидролиз полисахаридов серной кислотой с получением моносахаридов, образующих с антроном окрашенные комплексы сине-зеленого цвета с максимумом спектра поглощения при 520–625 нм. При разбавлении реакционной смеси этиловым спиртом максимум спектра поглощения смещается до 430 нм. Определение содержания полисахаридов проводили в пересчете на глюкозу, используя предварительно построенный калибровочный график зависимости величины оптической плотности глюкозы ($\lambda=430$ нм) от концентрации. В работе использовали спектрофотометр SmartSpecPlus.

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

Результаты и обсуждение

Учитывая, что гриб *Fomes fomentarius* содержит комплекс биологически активных веществ, обеспечивающих различные биологические активности, необходимо было разработать рациональную технологию полноценного извлечения действующих веществ из сырья. Одним из самых распространенных и чаще других используемых методов выделения БАВ является экстракция. Для проведения процесса экстракции важен выбор экстрагента и режим экстрагирования БАВ, поскольку основными факторами, влияющими на скорость и полноту экстракции биологически активных веществ из грибов, являются тип экстрагента, продолжительность экстракции, температура, степень измельченности сырья. Оценку результатов проводили по экстрактивным веществам. Для выделения БАВ из *F. fomentarius* использовали как статические, так и динамические методы экстракции: мацерацию, дробную мацерацию и перколяцию. Экстрагирование перколяцией осуществляли до полного истощения сырья, определяемого визуально по обесцвечиванию извлечения. Процесс

ремацерации проводили в три стадии настаивания при температуре 55–60 °С при соотношении сырья и экстрагента 1:12 на первой стадии, 1:10 на второй и 1:8 на третьей стадиях. Общее время экстракции 19 час. Для повышения эффективности экстракции биологически активных веществ из сырья применяли сверхвысокочастотную обработку (СВЧ). После охлаждения полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр, выпаривали на лабораторном вакуумном испарителе и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Полученный экстракт представляет собой аморфный мелко-дисперсный порошок коричневого цвета со специфическим запахом и содержанием влаги 4,6 %, гигроскопичен.

Для выбора оптимального экстрагента с целью получения максимального извлечения всех групп БАВ из *Fomes fomentarius* были изучены следующие экстрагенты: вода, спирт этиловый 40 %, 60 %, 70 % и 80 %. Показано, что при проведении процесса ремацерации выход экстрактивных веществ во всех извлечениях был достаточно высок для сырья природного происхождения и составлял от 1,4 до 5,0 %. Следует отметить, что максимальное содержание экстрактивных веществ ($5,6 \pm 0,7$) % выявлено в экстрактах, полученных с использованием спирта 70 %, минимальное содержание ($1,2 \pm 0,3$) % – при использовании в качестве экстрагента воды.

Поскольку для интенсификации процесса экстрагирования важна степень измельченности сырья, проведена оценка выхода экстрактивных веществ в зависимости от размера частиц плодового тела гриба *Fomes fomentarius*. Проведенные исследования позволили выбрать оптимальную степень измельченности гриба – наиболее полное извлечения БАВ наблюдалось для частиц размером от 50 до 500 мкм. Варьируя температуру экстрагирования от 20 до 80 °С, установлена оптимальная температура процесса, которая составила 55–60 °С. Включение в технологический процесс СВЧ нагрев на стадии экстрагирования позволило сократить время экстракции в 1,5 раза без снижения выхода экстрактивных веществ.

Изучение химического состава полученного сухого экстракта подтвердило наличие в данном грибе разнообразных БАВ, таких как белки и полисахариды, сапонины тритерпеновой группы, кумарины, фенольные соединения. Интерес представляет изучение полисахаридов и белков, так как именно с этими группами соединений связывают фармакологическое действие экстракта. Показано, что содержание белков в сухом экстракте из плодового тела гриба *Fomes fomentarius* находилось в пределах от 7,0 до 8,4 %, полисахаридов от 53,2 до 68,2 %.

Выводы

Установлены оптимальные значения технологических параметров процесса получения сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius* методом ремацерации. Проведен качественный

и количественный анализ БАВ, содержащихся в сухом экстракте, выявлены ведущие группы биологически активных веществ для последующей стандартизации экстракта.

Список литературы

1. Макаревич Е. В., Ибрагимова Ж. Б., Теплякова Т. В., Мазурков О. Ю., Бардашева А. В., Мазуркова Н. А. // Исследования вируснейтрализующих свойств экстрактов высших грибов группы порядков гастеромицеты *in vitro* в отношении вируса гриппа А // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №2. – С. 126-127.
2. Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. Приложение 2. – С. 118–119.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. – 1976 – №72. – С. 248-254.
4. Chena W., Zhao Z., Chena S. F. and Li Y. Q. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro* // Bioresource Technology. – 2008. – V. 99, №8. – 2008. – P. 3187-3194.
5. Lee J. S. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats // Nutrition Research. – 2005. – V25, №2. – P. 187-195.
6. Park Y. M., Kim I. T., Park H. J., Choi J. W., Park K.Y., Lee J. D. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius* // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2004. –V 27, №10. – P. 1588 – 1593.

Рецензенты:

Теплякова Тамара Владимировна, доктор биологических наук, профессор, заведующая сектором микологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская обл.

Белявская Валентина Александровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями ООИ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п.Кольцово, Новосибирская обл.