

На правах рукописи



**ЛИ НАТАЛЬЯ ГАВРОШЕВНА**

**ОБОСНОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ  
ПРОДУКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ ГРИБА *INONOTUS*  
*OBLIQUUS***

Специальность: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических  
активных веществ (технические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Департаменте пищевых наук и технологий Школы биомедицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» (ФГАОУ ВО ДВФУ).

**Научный руководитель:** **Каленик Татьяна Кузьминична**, Заслуженный работник Высшей школы РФ, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Гуринович Галина Васильевна**, доктор технических наук, профессор, профессор кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»

**Благонравова Майя Владимировна**, кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры технологии пищевых производств ФГБОУ ВО «Камчатский государственный технический университет»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Уральский государственный экономический университет**» (ФГБОУ ВО УрГЭУ)

Защита состоится 08 апреля 2021 г. в 14.00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета Д 999.189.02 на базе ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз» по адресу: 690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10, кампус ДВФУ, корпус А, 11 уровень, зал заседаний диссертационных советов.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» по адресу: 690091, г. Владивосток ул. Алеутская, 65-б или на сайте [www.dvfu.ru](http://www.dvfu.ru), в Библиотечно-информационном комплексе ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз» по адресу: 690087, Приморский край, г. Владивосток, ул. Луговая, 52-б или на сайте [www.dalrybvtuz.ru](http://www.dalrybvtuz.ru).

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 690922, г. Владивосток, о. Русский, нп-Аякс-10, кампус ДВФУ, корпус А, каб. А1133, Объединенный диссертационный совет Д999.189.02, e-mail: [D\\_999.189.02@dvfu.ru](mailto:D_999.189.02@dvfu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат технических наук



В.А. Лях

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Актуальность диссертационного исследования обусловлена основными положениями следующих документов федерального значения: «Доктрина продовольственной безопасности РФ», «О стратегии научно-технологического развития РФ», «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года», «Прогноз научно-технологического развития России до 2030 года».

Мясные продукты составляют объемный сегмент рынка пищевой продукции. Увеличение объемов производства продукции мясоперерабатывающей отрасли связано также и с развитием экспортной политики в области производства сельскохозяйственной продукции в Российской Федерации.

С другой стороны, актуальная в настоящее время проблема дефицита поступления белков в структуре питания современного населения является причиной роста заболеваний с детерминантами пищевого характера, требует для своего решения широкого внедрения инновационных биотехнологий для создания экологически безопасного производства социально значимых пищевых продуктов с различными функциональными свойствами и обогащенных биоактивными природными компонентами.

Однако, из-за высокого содержания в своем составе липидов, особенно моно- и полиненасыщенных жирных кислот, мясо и мясные продукты подвержены окислительной порче на всех этапах технологического процесса.

Наибольший интерес у исследователей с позиции изучения влияния антиоксидантов на окислительные процессы вызывают такие объекты как масложировые продукты и мясные рубленые полуфабрикаты. Предрасположенность данных продуктов к окислению во время предварительной обработки и длительного хранения в условиях высокой удельной поверхности обуславливает необходимость использования различных типов антиоксидантов.

Протекание окислительных процессов в пищевых продуктах ухудшает качество и снижает безопасность пищевой продукции на всех этапах

прослеживаемости пищевой продукции. В последние годы появились новые данные о влиянии продуктов окисления липидов на здоровье человека, в том числе и об их канцерогенном и мутагенном действии.

Имеются сведения, что гриб *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilat ввиду особенностей своего поликомпонентного состава вызывает особый интерес как природное сырье для получения антиоксидантных соединений и их дальнейшего использования в пищевых технологиях. Экстракты гриба *I. obliquus* содержат высокомолекулярный пигментный или полифенольный комплекс, имеющий сложный химический состав, значительную часть в котором занимают разнообразные фенольные соединения: гидроксикоричные кислоты (цикориевая, кафтаровая, хлорогеновая, феруловая, кофейная), полифенольные соединения (в т.ч. кверцетин и др.), а также органические кислоты и бетулин.

Соединения полифенольного комплекса гриба *I. obliquus* обладают биологически активными свойствами: антибактериальными, противоопухолевыми, противовоспалительными, антиоксидантными, а также эффективно подавляют перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот.

Однако, несмотря на высокий биогенный и биотехнологический потенциал гриба *I. obliquus*, в научной литературе недостаточно сведений о широком использовании извлечений гриба в качестве компонентов пищевой системы.

В этой связи, представляются актуальными исследования, направленные на разработку биотехнологии получения экстрактов гриба *I. obliquus* и их внедрение в технологии пищевых продуктов в качестве новых пищевых ингредиентов с антиоксидантным действием.

**Степень разработанности темы.** Значительный вклад в изучение процессов получения и использования биологически активных веществ растительного и животного сырья в отношении совершенствования технологий пищевых продуктов, в том числе и мясных, внесли следующие ученые: Л.В. Антипова, В.А. Тутельян, А.Б. Лисицын, В.М. Позняковский, Ю.Г. Базарнова, С.Л. Тихонов, Л.С. Байдалинова, О.В. Табакаева, Г.В. Гуринович,

Л.А. Маюрникова, Н.Ф. Кушнерова, Т.К. Каленик, Л.Н. Федянина, М.В. Палагина, М.В. Благонравова, О.Н. Голуб, В.И. Криштафович, Н.Н. Толкунова, В.В. Хорольский, Г.И. Касьянов, С. Zhen-Yu, J. Goncalves, V. Somoza, Н.У. Ahn, Н.Д. Cho, G.B. Gonzales и др. Однако, в научной литературе недостаточно сведений об использовании в технологии пищевых продуктов экстрактов гриба *I. obliquus*, полученных высокотехнологичными и экологически безопасными способами.

**Цель диссертационной работы:** обоснование и разработка биотехнологии пищевых продуктов с использованием экстрактов гриба *I. obliquus*.

**Задачи** диссертационного исследования:

1. Разработать биотехнологию получения экстракта гриба *I. obliquus* с применением сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции.
2. Провести оценку эффективности степени диспергирования гриба *I. obliquus* в отношении выхода антиоксидантных соединений.
3. Обосновать оптимальные параметры сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции гриба *I. obliquus*.
4. Установить компонентный состав водного и сверхкритического CO<sub>2</sub> экстрактов гриба *I. obliquus*.
5. Обосновать использование объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* в технологии мясного рубленого охлажденного полуфабриката.
6. Исследовать влияние объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* на окислительные процессы, протекающие в липидах.
7. Провести оценку влияния объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* на стабилизацию показателей качества и безопасности, прослеживаемых в процессе хранения мясного рубленого охлажденного полуфабриката.
8. Провести оценку относительной биологической ценности и безопасности полученных экстрактов гриба *I. obliquus* и мясного рубленого охлажденного полуфабриката на тест-организме инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

**Научная новизна работы.** Разработана биотехнология получения экстрактов гриба *I. obliquus* с использованием сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода. Научно обосновано использование оптимальных параметров давления от 200 до 300 бар и температуры 60 °С для проведения сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции гриба *I. obliquus*. Определены особенности химического состава водного и сверхкритического экстрактов методом тандемной масс-спектрометрии. Показана эффективность внесения объединенного сухого экстракта в состав мясного рубленого охлажденного полуфабриката для ингибирования окислительных процессов. Установлена безопасность использования экстрактов гриба *I. obliquus* как новых пищевых компонентов на тест-организме инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс направлений подготовки 19.03.01 «Биотехнология», 19.04.01 «Биотехнология», 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения» и использованы при написании рабочих программ учебных дисциплин по указанным направлениям.

Материалы диссертации были использованы при составлении учебного пособия «Современная инновационная биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ», рекомендованного ДВ РУМЦ для аспирантов и студентов, обучающихся по направлениям подготовки 19.06.01 «Промышленная экология и биотехнологии», 19.04.01 «Биотехнология», 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения», 19.04.05 «Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения».

Разработанные технологии прошли апробацию путем выработки опытно-экспериментальной партии образцов продукции в Лаборатории химии и технологии пищевых систем Департамента пищевых наук и технологий Школы биомедицины ДВФУ.

Разработан и утвержден Стандарт организации ДВФУ (СТО) 02067942-010-2017 Экстракт березового гриба «Таежный». Технические условия. Новизна

технических решений подтверждена решением о выдаче патента на изобретение «Состав для приготовления фарша», заявка № 2020117350/10, дата приоритета 27.05.2020.

**Методология и методы исследования.** Методологическую основу исследования составили как теоретические, так и эмпирические методы получения новых знаний: лазерная дифракция, сверхкритическая флюидная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, физико-химические и микробиологические методы, биотестирование.

**Положения, выносимые на защиту:**

- разработанная биотехнология получения экстрактов гриба *I. obliquus* с применением оптимальных параметров сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции обеспечивает высокий выход антиоксидантных веществ;
- эффективность объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* в отношении ингибирования окисления липидов в мясном рубленом охлажденном полуфабрикate в процессе хранения;
- безопасность использования экстрактов гриба *I. obliquus* в технологии пищевых продуктов.

**Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационная работа содержит элементы научной новизны в рамках пунктов 1, 3, 13 паспорта специальности 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается проведением достаточного количества наблюдений и экспериментов, использованием валидированных методик и современных аналитических инструментальных методов анализа. Статистический анализ и интерпретация экспериментально полученных данных проведены с использованием современных программных инструментов и методов обработки данных.

**Апробация результатов.** Результаты работы докладывались на международных, всероссийских и региональных конференциях и конгрессах в период с 2016 по 2020 гг., основными из которых являются: IV Международный Балтийский морской форум, Калининград, 2016; Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 20-22 февраля 2017, Москва; VI Международная научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология», Калининград, 21-27 мая 2017; VI Национальная научная конференция «Инновации в технологии продуктов здорового питания», Калининград, 2019; III Всероссийская конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов и студентов «Актуальные проблемы и вопросы технологии производства продукции общественного питания, животноводства и растениеводства», Казань, 2020; IV Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы развития производства пищевых продуктов: технологии, качество, экология, оборудование, менеджмент и маркетинг», Уссурийск, 20-21 февраля 2020 г.

**Личное участие автора.** Личное участие автора заключается в проведении всех экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных данных. В результате завершенного диссертационного исследования автором самостоятельно осуществлена практическая реализация цели данной работы и сформулированы выводы. Автор принимал самостоятельное участие в подготовке и написании материалов для статей, пособия, получения патента, опубликованных по материалам диссертации.

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 15 научных работах, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 174 страницах, содержит 18 таблиц и 38 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка использованных источников (206 источников литературы, в том числе 66 иностранных) и 9 приложений.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дано обоснование актуальности темы, сформулированы цель, задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость работы.

В **главе 1** приведены литературные данные по компонентному составу и биологической активности экстрактов гриба *I. obliquus*, описаны способы экстракции гриба *I. obliquus*, рассмотрены основные проблемы сохранения качества и безопасности продуктов животного происхождения, представлены возможности использования природных антиоксидантов для стабилизации липидов мясных продуктов.

В **главе 2** представлена организация и основные направления диссертационного исследования (рисунок 1), определены объекты и методы исследований. Объектами исследований являлись: водный экстракт гриба *I. obliquus*; сверхкритический CO<sub>2</sub>- экстракт гриба *I. obliquus*; объединенный сухой экстракт гриба *I. obliquus*, полученный в результате лиофильного высушивания соединенных вместе водного и сверхкритического CO<sub>2</sub>- экстрактов гриба *I. obliquus*; мясной рубленый охлажденный полуфабрикат (фарш из свинины и мяса кур).

При выполнении экспериментальной части диссертационной работы использовались стандартные и общепринятые физико-химические, микробиологические и органолептические методы исследований. Антиоксидантную активность оценивали путем измерения антирадикальной активности с DPPH радикалами. Диспергирование исходного сырья гриба проводили на планетарной мельнице Pulverisette 4. Измерения гранулометрического состава исследуемых образцов проводили методом лазерной дифракции на анализаторе Analysette 22 NanoTec plus. Сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракт получали путем использования сверхкритической системы флюидной экстракции Thar SFE-500F-2-FMC50. Объединенный сухой экстракт получали лиофилизацией на Freeze dryer.

Тандемную масс-спектрометрию проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence HPLC и масс-спектрометре amaZon SL.

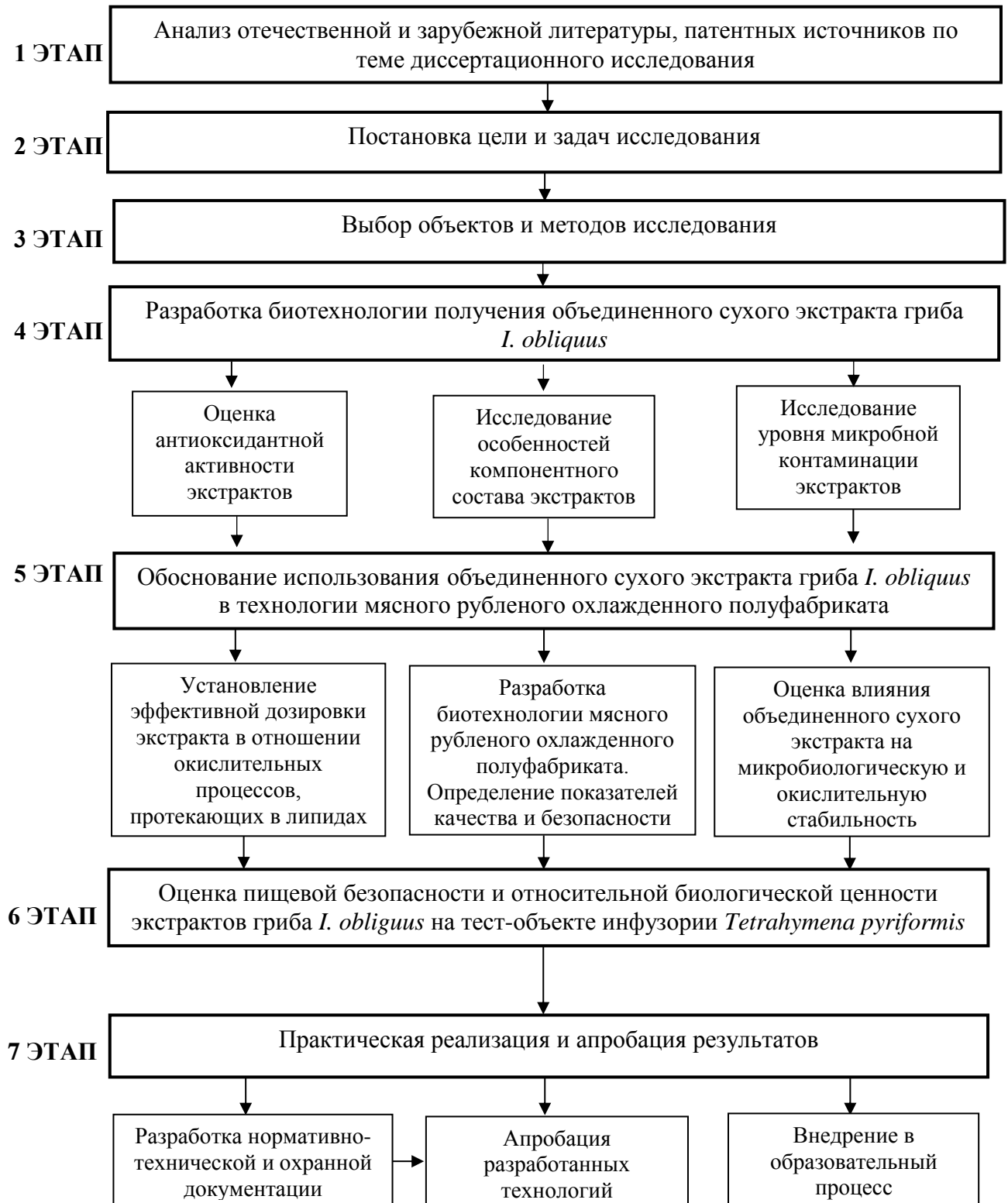


Рисунок 1 – Общая схема диссертационного исследования

Масс-спектрометрические данные высокой точности записаны на масс-спектрометре amaZon SL вида «ионная ловушка». Перекисное число определяли по ГОСТ 34118, кислотное число по ГОСТ Р 55480. Определение ОБЦ и безвредности экстракта проводили на тест-организме инфузории *Tetrahymena pyriformis* (Шульгин и др., 2006). Определение показателей качества и безопасности сырья и опытных образцов продукции проводили на соответствие требованиям действующей нормативной документации: ТР ТС 021/2011, ТР ТС 034/2013, ГОСТ Р 55365, ГОСТ 32951. Для математической аппроксимации экспериментально полученных данных использовали метод регрессионного анализа с применением программ STATISTICA 13.3 и Microsoft Excel 2016. Результаты рассматривались как достоверные при уровне значимости 95 % ( $P < 0,05$ ).

В главе 3 представлены данные по гранулометрической характеристике частиц гриба *I. obliquus* после диспергирования, приведены результаты исследования выхода антиоксидантных веществ (меланина); обоснованы параметры сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции гриба *I. obliquus* и предложена биотехнология получения объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus*.

Установлено, что диспергирование сырья гриба на планетарной мельнице Pulverisette 4 позволяет получить более однородный тонкодисперсный порошок с низким содержанием крупноразмерных частиц по сравнению с диспергированием на ножевой мельнице. Большая часть фракции 41,5 %, полученной на планетарной мельнице, была представлена частицами размером 50 мкм. Массовая доля частиц размером от 2 до 50 мкм составила 93,8 %, что в 1,8 раза больше данного показателя для фракции, полученной на ножевой мельнице.

Для дальнейшей оценки эффективности различных способов диспергирования сырья были исследованы значения выхода меланина в водных извлечениях гриба *I. obliquus* (рисунок 2). Из данных рисунка 2 видно, что диспергирование на планетарной мельнице в 2,3 раза увеличивает выход меланина.

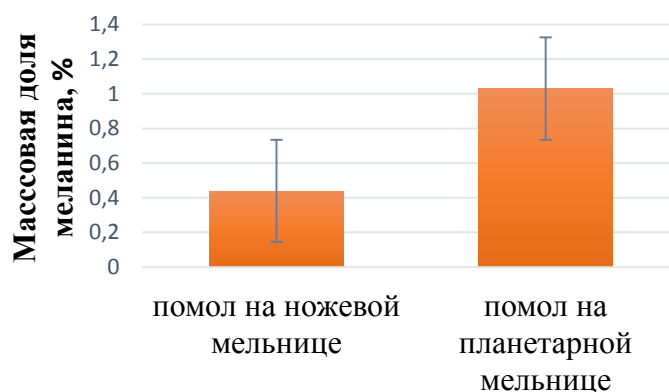


Рисунок 2 – Выход меланина в экстрактах гриба *I. obliquus* из сырья, диспергированного разными способами

Далее был проведен анализ и аппроксимация результатов эксперимента по выбору оптимальных параметров сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции гриба *I. obliquus*. Установлены зависимости выхода сухих веществ и меланина от температуры и давления (рисунок 3, 4). Обосновано, что максимальный выход экстрактивных веществ обеспечивается при давлении от 200 до 300 бар и температуре 60 °С.

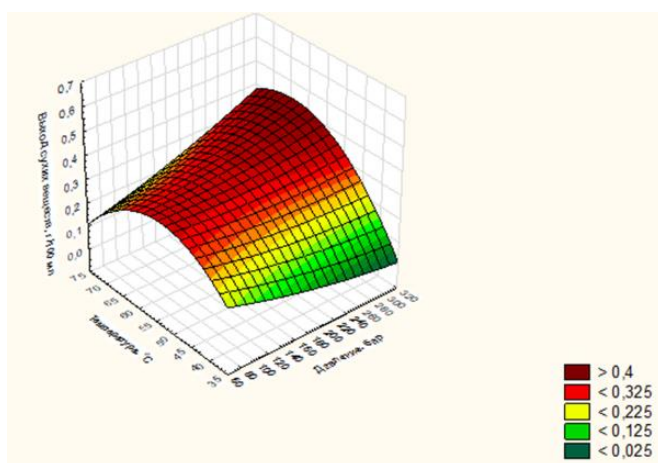


Рисунок 3 – Зависимость выхода сухих веществ от двух независимых переменных: температуры и давления

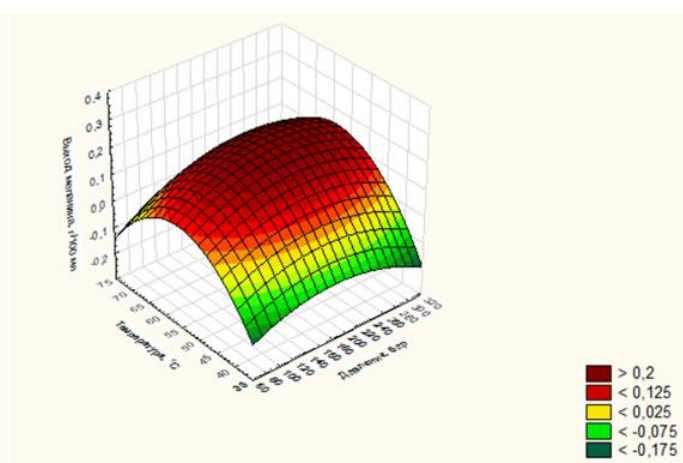


Рисунок 4 – Зависимость выхода меланина от двух независимых переменных: температуры и давления

Технологическая схема получения объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* представлена на рисунке 5. Основными этапами биотехнологии получения объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* являются: диспергирование сырья гриба *I. obliquus*, водная экстракция исходного сырья, экстракция сверхкритическим диоксидом углерода обедненного сырья,

оставшегося после водной экстракции, и лиофильное высушивание объединенного жидкого экстракта.



Рисунок 5 – Биотехнология получения объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus*

Для оценки антиоксидантной активности экстрактов гриба *I. obliquus* использовали метод, основанный на реакции с DPPH радикалами. Показано, что объединенный сухой экстракт гриба *I. obliquus* обладает АРА эквивалентной АРА 394,54 мкг/мл аскорбиновой кислоты (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели антирадикальной активности экстрактов гриба *I. obliquus*

Виды экстрактов гриба <i>I. obliquus</i>	Показатели антирадикальной активности			
	EC <sub>50</sub>	T <sub>EC50</sub> , мин	АЕ	Эквивалентность АРА экстракта АРА аскорбиновой кислоты, мкг/мл
Водный экстракт	0,33%	17	51,51	175,81
Сверхкритический CO <sub>2</sub> -экстракт	45,4%	6	0,13	112,47
Объединенный сухой экстракт	0,08 мг/мл	2	25	394,54

Результаты исследования антиоксидантной активности позволяют сделать вывод об эффективности разработанной биотехнологии получения объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* в отношении извлечения антиоксидантных соединений гриба.

В результате проведенного микробиологического анализа образцов экстрактов гриба *I. obliquus*, полученных путем водной и сверхкритической флюидной экстракции, установлено, что в течение всего испытываемого срока хранения (36 мес.), показатели, характеризующие микробную обсемененность экстрактов, оставались на низком уровне. Данные анализа свидетельствуют о бактерицидном действии сверхкритического диоксида углерода в отношении контаминирующей микрофлоры экстракта гриба *I. obliquus*.

В главе 4 установлены особенности компонентного состава экстрактов гриба *I. obliquus*. При анализе данных плотности распределения экстрактивных соединений на ионной хроматограмме, обнаружено, что экстрактивные соединения водного экстракта характеризуются значениями ионных масс  $m/z$  в диапазоне от 400,0 до 1000,0. Большая часть экстрактивных соединений, извлеченных из обедненного остатка сверхкритическим диоксидом углерода, имеет значения  $m/z$  в диапазоне от 565,0 до 565,8.

Установлено, что водная экстракция гриба *I. obliquus* позволяет преимущественно извлекать вещества с относительно низкими молекулярными массами  $m/z$  (от 110 до 302), которые относятся к фенольным и полифенольным

соединениям. Показано, что сверхкритический диоксид углерода обладает высокой растворяющей способностью к соединениям с высокими молекулярными массами (от 379 до 472), представляющими собой тритерпеновые и стероидные соединения.

В водном и сверхкритическом экстрактах методом tandemной масс-спектрометрии идентифицировано 18 и 14 индивидуальных соединений соответственно. В таблице 2 приведены результаты идентификации соединений сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *I. obliquus*. Структурно-групповой состав экстракта составляют углеводороды, полифенолы, стерины, стеролы, тритерпены ланостанового типа, тритерпеновые спирты и эфиры.

Таблица 2 – Данные tandemной масс-спектрометрии сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *I. obliquus*

Идентифицированные соединения	Значение m/z	Время удержания
1. Бетулин	443,38	67,9
2. Инотодиол	442,38	87,5
3. Ланостан-3-ил ацетат	472,78	56,1
4. Кампестерин	399,36	64,2
5. Эргостерол	379,4	48,9
6. Галловая кислота	170,02	15,9
7. Сиреневая кислота	198,17	41,0
8. Траметеноловая кислота	456,36	82,9
9. Протокатеховая кислота	154,03	68,6
10. Эргостерол пероксид	428,32	24,8
11. Кверцитин	302,04	42,4
12. Лупеол	427	87,5
13. п-гидроксibenзойная кислота	138,03	43,6
14. Этиловый эфир янтарной кислоты 3-метилбут-3-ениловый эфир	250,27	45,6

Показана идентификация масс-спектра на примере вещества бетулина (рисунок 6). Значение  $m/z$ , полученное в режиме отрицательной ионизации на первой ступени для материнского иона равно 443,17.

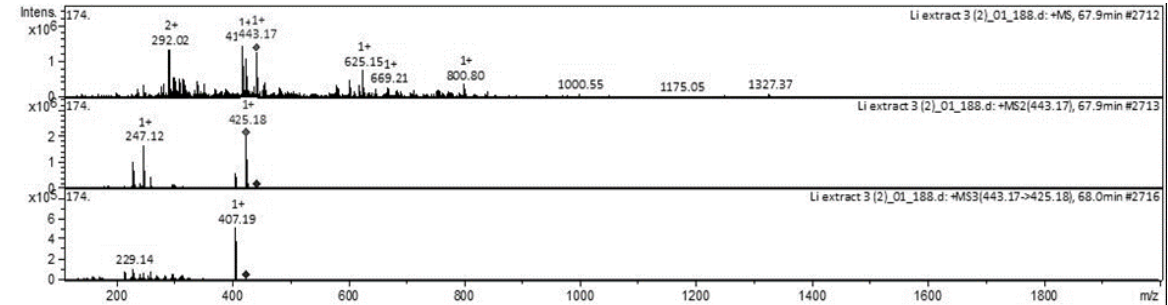


Рисунок 6 – Масс-спектр бетулина, идентифицированного в сверхкритическом  $\text{CO}_2$ -экстракте *Inonotus obliquus*

Использование полярного растворителя (вода) на первом этапе экстракции и сверхкритического диоксида углерода в качестве неполярного основного экстрагента и соразтворителя этанола на втором этапе позволяет увеличить эффективность извлечения биологически активных соединений гриба *I. obliquus* за счет избирательного извлечения каждым экстрагентом соединений с определенными молекулярными массами.

В главе 5 была обоснована эффективная дозировка экстракта на образцах рубленого свиного шпика (рисунок 7, 8), проведено исследование влияния объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* на показатели качества и безопасности мясного рубленого охлажденного полуфабриката.

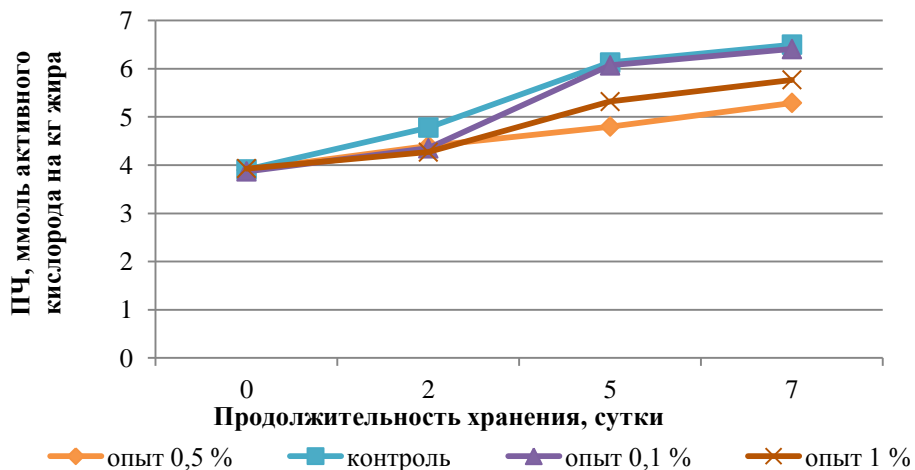


Рисунок 7 – Динамика изменения ПЧ образцах рубленого свиного шпика



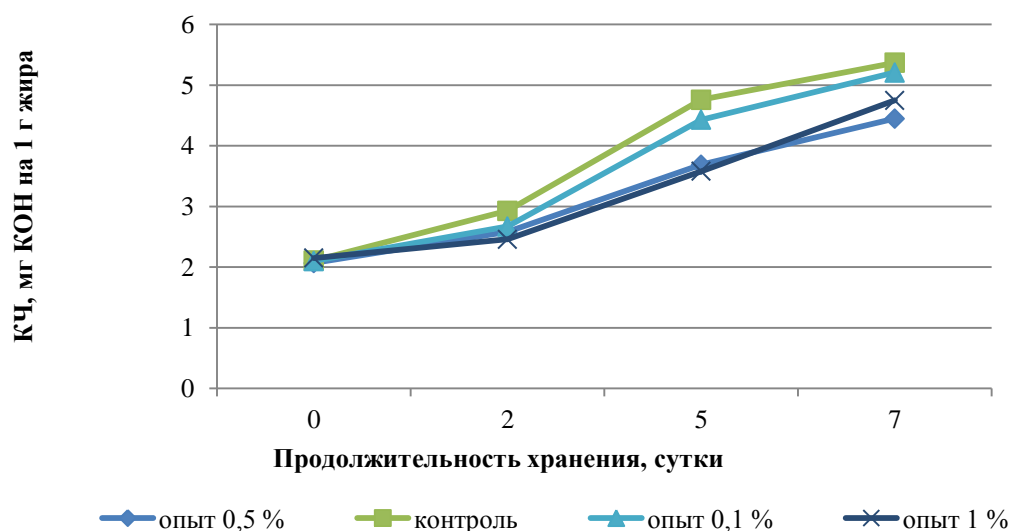


Рисунок 8 – Динамика изменения КЧ в образцах рубленого свиного шпика

Полученные результаты свидетельствуют об активных окислительных процессах, протекающих в контрольном образце свиного шпика без антиоксидантной защиты, и свидетельствуют о целесообразности использования объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus* в концентрации 0,5 % для предотвращения гидролитических и окислительных процессов в мясных рубленых полуфабрикатах, предназначенных для хранения в охлажденном состоянии. Ингибирующее действие объединенного сухого экстракта гриба *I. obliquus*, предположительно связано с активным антиоксидантным действием жирорастворимых соединений, извлеченных сверхкритическим диоксидом углерода, которые обладают высокой растворимостью в липидных компонентах свиного шпика, тем самым обеспечивая эффективность использования экстракта.

Показатели качества и безопасности, прослеживаемые в процессе хранения мясного рубленого охлажденного полуфабриката с объединенным сухим экстрактом гриба *I. obliquus*, соответствуют требованиям, предъявляемым ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013.

В процессе всего срока холодильного хранения 7 сут при температуре от 0 °С до плюс 4 °С для опытного образца не были выявлены превышения нормативных значений для санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов (таблица 3).

Таблица 3 – Микробиологические показатели безопасности мясного рубленого охлажденного полуфабриката «Фарш из свинины и мяса кур» с добавкой объединенного сухого экстракта *I. obliquus* в течении 7 сут (опыт и контроль)

Показатель	Допустимые уровни ТР ТС 021/2011, ТР ТС 034/2013	Фактическое значение							
		0 (фон)		2 сут		5 сут		7 сут	
		опыт	контр оль	опыт	контр оль	опыт	контр оль	опы т	контр оль
Бактерии <i>Listeria monocytogenes</i> в 25 г	Не доп.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.
Патогенные, в том числе сальмонеллы в 25 г	Не доп.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.
КМАФАнМ, КОЕ/г	не более $5 \cdot 10^6$	3,1* $10^4$	3,3* $10^4$	4,2* $10^5$	4,6* $10^5$	2,8* $10^6$	3,4* $10^6$	4,2* $10^6$	5,7* $10^6$
БГКП в 0,0001 г	не доп.	отс.	отс.	отс.	отс.	отс.	отс.	отс.	отс.

Таким образом, в результате сравнительного анализа показателей безопасности мясного рубленого охлажденного полуфабриката, полученных для опытного и контрольного образцов, установлено, что внесение в состав мясного рубленого охлажденного полуфабриката «Фарш из свинины и мяса кур» объединенного сухого экстракта *I. obliquus* стабилизирует показатель, характеризующий количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Превышение этого нормативного показателя в конце срока для контрольного образца на 7 сут. свидетельствует об активном размножении микроорганизмов, в числе которых могут оказаться патогенные и условно-патогенные, что в конечном итоге приводит к порче продукта и его непригодности для дальнейшей реализации. Проведенная оценка позволяет установить срок хранения мясного рубленого охлажденного полуфабриката 7 сут.

В главе 6 представлена оценка безопасности и относительной биологической ценности экстрактов гриба *I. obliquus* и мясного рубленого

охлажденного полуфабриката с объединенным сухим экстрактом гриба *I. obliquus* на тест-объекте инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

Оценку ОБЦ экстрактов гриба *I. obliquus* проводили по сравнению с ОБЦ стандартного белка – казеина. За 100 % показателя относительной биологической ценности было взято значение ОБЦ, установленное для казеина. Наибольшее значение ОБЦ установлено для образца сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта на 3 сут. инкубации и превысил ОБЦ казеина на 265,3 % (рисунок 9).

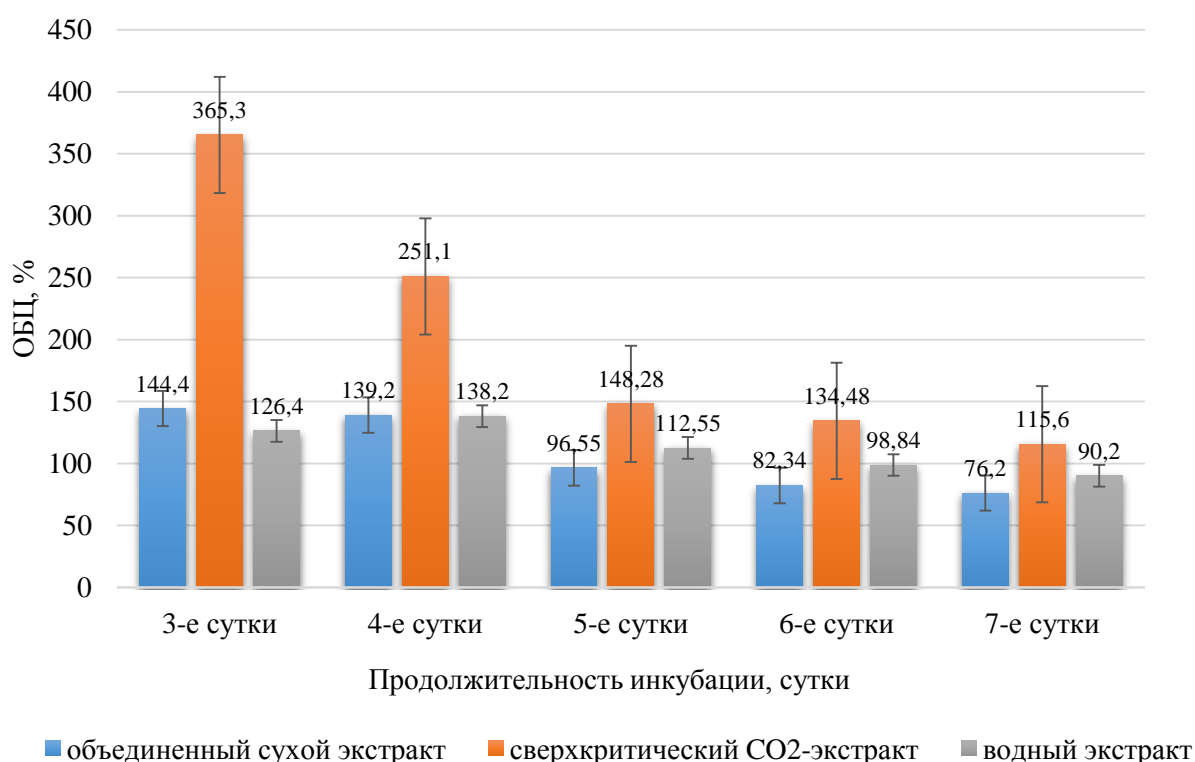


Рисунок 9 – ОБЦ экстрактов гриба *I. obliquus* (контроль казеин)

По-видимому, это связано с особенностями компонентного состава и структуры соединений сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта, термо- и оксилабильные соединения которого оказывают стимулирующее влияние на рост и размножение инфузорий в опытном образце. При рассмотрении динамики изменения ОБЦ в течении эксперимента, зафиксировано снижение показателя ОБЦ по сравнению с контролем как для сухого экстракта, так и для сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта, однако следует заметить, что снижение ОБЦ обусловлено общим снижением числа инфузорий в конце эксперимента, связанным с израсходованием и дефицитом питательного субстрата.

В результате оценки морфологических показателей тест-объекта на зафиксированном препарате отмечены более крупный размер клеток инфузорий, культивируемых в среде с добавлением сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *I. obliquus* (рисунок 10, а-г).

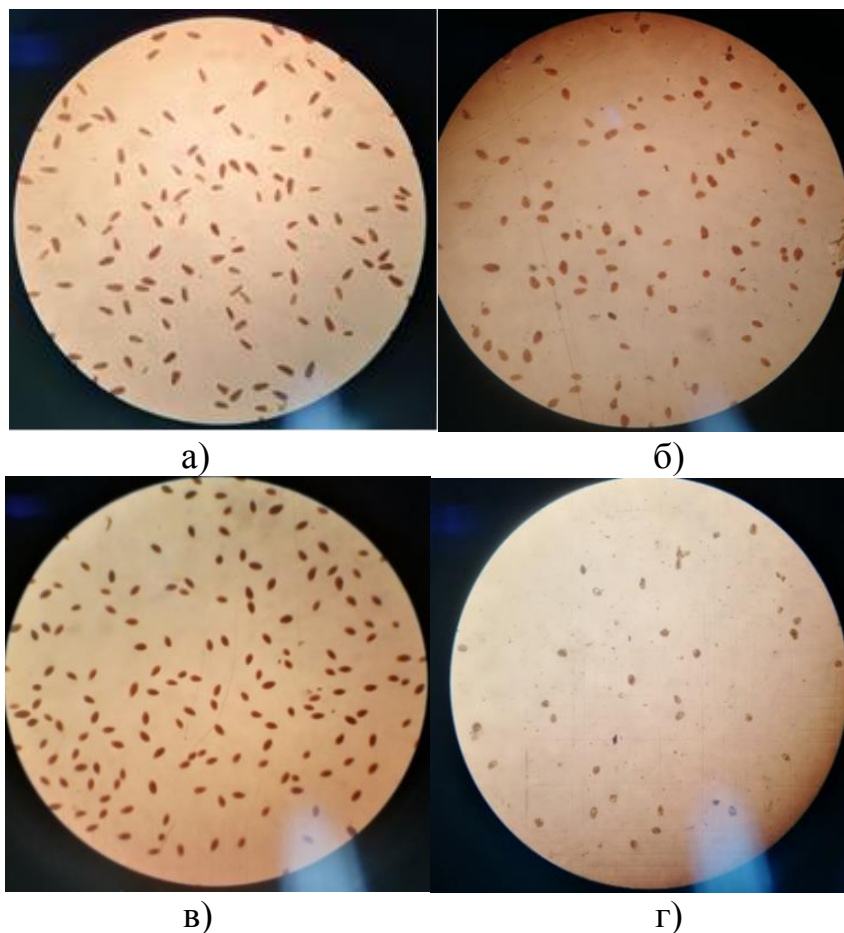


Рисунок 10 – Зафиксированный препарат инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в эксперименте определения ОБЦ экстрактов гриба *I. obliquus* (а – объединенный сухой экстракт; б – водный экстракт; в - сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракт; г – контроль казеин)

Внесение сухого экстракта гриба *I. obliquus* в состав мясного рубленого полуфабриката повышает относительную биологическую ценность продукта на 69,71 %. Таким образом, все испытуемые на тест-культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis* экстракты гриба *I. obliquus* характеризуются высокими показателями ОБЦ и являются безопасными в качестве ингредиентов пищевых систем.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам диссертационной работы можно сделать следующие выводы:

1. Разработана биотехнология получения объединенного сухого экстракта гриба *Inonotus obliquus*, направленная на извлечение экстрактивных веществ с антиоксидантной активностью. Оптимизация параметров сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции позволяет обеспечить эффективный выход целевых компонентов гриба *Inonotus obliquus*.

2. Диспергирование гриба *Inonotus obliquus* на планетарной мельнице, обеспечивает получение фракции частиц гриба размером от 2 до 50 мкм, что экспериментально повышает экстракционный выход антиоксидантных соединений 2,3 раза, в отличие от диспергирования на ножевой мельнице, для которой характерно образование на выходе фракции частиц в более широком размерном диапазоне (от 0,5 до 1250 мкм).

3. Наибольший выход экстрактивных веществ при сверхкритической CO<sub>2</sub>-экстракции гриба *Inonotus obliquus* достигается установлением параметров давления в диапазоне от 200 до 300 бар и температуры 60 °С. Извлечение сухих веществ в большей степени зависит от изменения температуры, а количественный выход меланина находится в большей зависимости от изменения параметра давления.

4. В водном и сверхкритическом экстрактах методом tandemной масс-спектрометрии идентифицировано 18 и 14 индивидуальных соединений соответственно. Структурно-групповой состав экстракта составляют углеводороды, полифенолы, стерины, стеролы, тритерпены ланостанового типа, тритерпеновые спирты и эфиры.

5. Обосновано применение объединенного сухого экстракта гриба *Inonotus obliquus* в технологии мясного рубленого охлажденного полуфабриката в отношении стабилизации окисления липидов и снижения уровня бактериальной обсемененности. Разработанная биотехнология получения мясного рубленого

охлажденного полуфабриката с объединенным сухим экстрактом гриба *Inonotus obliquus* характеризуется отсутствием технологических рисков.

6. Показатели качества и безопасности, прослеживаемые в процессе хранения мясного рубленого охлажденного полуфабриката с объединенным сухим экстрактом гриба *Inonotus obliquus*, соответствуют требованиям, предъявляемым ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013.

7. По результатам испытания экстрактов гриба *Inonotus obliquus* на тест-организме инфузории *Tetrahymena pyriformis* установлено, что полученные экстракты характеризуются высокими показателями относительной биологической ценности и безопасны для внесения в пищевые продукты. Внесение объединенного сухого экстракта гриба *Inonotus obliquus* в состав мясного рубленого охлажденного полуфабриката повышает относительную биологическую ценность продукта на 69,71 %.

### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации**

#### ***Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ***

1. **Ли, Н.Г.** Влияние степени измельчения сырья березового гриба *Inonotus obliquus* на выход экстрактивных веществ, обладающих антиоксидантной активностью / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. №3. – Том 8. – 2019. - С. 118-122.

2. **Ли, Н.Г.** Исследование компонентного состава CO<sub>2</sub>-экстракта березового гриба *Inonotus obliquus* методом хромато-масс-спектрометрии / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, Е.В. Моткина, М.А. Моткина // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. - №1 (49). – Том 9. – 2020. – С. 105-109.

#### ***Патенты РФ на изобретение***

3. «Состав для приготовления фарша», заявка № 2020117350/10(029055), дата приоритета 27.05.2020 (выдано решение о выдаче патента, вх. письмо Роспатента № 2020117350/10(029055) от 15.12.2020).

**Учебные пособия**

4. Каленик Т.К. Современная инновационная биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ: учеб. пособие / Т.К. Каленик, Ю.В. Приходько, А.В. Алешков, Т.А. Сенотрусова, Е.В. Добрынина, Е.В. Моткина, Е.В. Медведева, Г.В. Медведев, **Н.Г. Ли**. – Владивосток: Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – 1 CD-ROM; [171 с.]. – Загл. с титул. экр. – ISBN 978-5-7444-4915-5. – Текст. Изображения: электронные».

**Материалы конференций**

5. Каленик, Т.К. Антиоксиданты растительного генеза для мясной индустрии / Т.К. Каленик, **Н.Г. Ли**, А.В. Алешков, Е.В. Моткина // IV Международный Балтийский морской форум [Электронный ресурс]: материалы Международного морского форума. Калининград: Изд-во БГАРФ, 2016. – С. 1355-1361.

6. Каленик, Т.К. Использование экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* в биотехнологии продуктов питания животного происхождения / Т.К. Каленик, **Н.Г. Ли**, А.В. Давыденко, С.П. Касьянов, Х.А. Фаттохов // Инновационные решения при производстве продуктов питания из растительного сырья [Текст]: сборник научных статей и докладов II Международной научно-практической конференции (заочной) (г. Воронеж, 26-27 октября 2016 г.) / редкол.: Г. В. Агафонов [и др.]; ФГБОУ ВО «ВГУИТ». – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2016. – С. 138-139.

7. **Ли, Н.Г.** Получение антиоксидантов из березового гриба чага *Inonotus obliquus* для пищевых продуктов / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик // Инновации в биотехнологии аквакультуры и водных биоресурсов Японского моря: Междунар. науч. конф., г. Владивосток, 07-12 июня : материалы / [сост. В.А. Лях; ред. кол.: Т.К. Каленик, И.А. Кадникова, О.В. Табакаева, Л.Н. Федянина]. – Владивосток: Дальневост. федерал. ун-т, 2016. – С. 27-31.

8. **Ли, Н.Г.** Использование растительных антиоксидантов в технологии мясопродуктов // IV Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов (по итогам научно-исследовательской работы Школы биомедицины

ДВФУ за 2015–2016 годы), Владивосток, 18 мая 2016 г. [Электронный ресурс]: сборник материалов / Дальневост. федерал. университет; под общ. ред. К.Е. Макарова, А.В. Бондарь. – Электрон. дан. – Владивосток: Дальневост. федерал. ун-т, 2016. – С. 26-32. Режим доступа: [https://www.dvfu.ru/science/student\\_scientific\\_life/proceedings-of-student-activities/](https://www.dvfu.ru/science/student_scientific_life/proceedings-of-student-activities/) – Загл.с экрана.

9. **Ли, Н.Г.** Применение антиоксидантов из березового гриба чага (*Inonotus obliquus*) в мясных продуктах / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, С.А. Ищенко, Н.А. Михеева, Е.В. Моткина, А.В. Давыденко // IX Международный конгресс Биотехнология: Состояние и перспективы развития, 20-22 февраля. – Москва, 2017. – Том 2. – С. 229-230.

10. **Ли, Н.Г.** Использование экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* в качестве антиокислителей в продуктах питания животного происхождения / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, Е.В. Моткина // Актуальные вопросы развития производства пищевых продуктов: технологии, качество, экология, оборудование, менеджмент и маркетинг: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 60-летию со дня образования ФГБОУ ВО Приморская ГСХА, 21-21 февраля 2017 г. – ФГБОУ ВО Приморская ГСХА; отв. ред. С. В. Иншаков. – Уссурийск, 2017. – С. 99-108.

11. Каленик, Т.К. Использование растительных антиоксидантов для защиты липидов морских гидробионтов / Т.К. Каленик, **Н.Г. Ли**, Е.В. Моткина // V Международный «Балтийский морской форум». VI Международная научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология», 21-27 мая 2017. Часть 8. – Калининград, 2017. – Изд-во БГАРФ, 2017. – С. 53-55.

12. **Ли, Н.Г.** Эффективность натуральных антиоксидантов для защиты липидных компонентов в мясных продуктах / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, Р.С. Ковалев // Актуальные вопросы развития производства пищевых продуктов: технологии, качество, экология, оборудование, менеджмент и маркетинг: материалы II Всероссийской научно-практической конференции, 01-02 марта 2018 г. - ФГБОУ ВО Приморская ГСХА; отв. ред. С.В. Иншаков. – Уссурийск, 2018. – С. 135-143.



13. **Ли, Н.Г.** Пигменты березового гриба *Inonotus obliquus* как альтернатива синтетическим антиоксидантам в пищевой промышленности // Дни науки [Электронный ресурс]: сборник материалов научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Владивосток, 16 апреля – 18 мая 2018 г.). В 3 ч. Ч. 1. Материалы Школы биомедицины и Школы искусств и гуманитарных наук ДВФУ. Электрон. дан. Владивосток: Изд-во Дальневосточного федерального ун-та, 2018. – С. 38-39. Режим доступа: [https://www.dvfu.ru/upload/medialibrary/4ee/Дни науки 2018\\_Часть 1.pdf](https://www.dvfu.ru/upload/medialibrary/4ee/Дни науки 2018_Часть 1.pdf). - Загл. с экр. – ISBN 978-5-7444-4309-2. – DOI dx.doi.org/10.24866/7444-4309-2

14. **Ли, Н.Г.** Изучение влияния экстракта гриба *Inonotus obliquus* на окислительные процессы, протекающие в мясном рубленом полуфабрикате / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик // Сборник VII Международного Балтийского морского форума, VI Национальная научная конференция «Инновации в технологии продуктов здорового питания». – Калининград, 2019. – С. 62-65.

15. **Ли, Н.Г.** Стабилизация защиты окисления продуктов животного происхождения компонентами сверхкритической экстракции гриба *Inonotus obliquus* / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, А.Е. Моткин, М.А. Моткина // Актуальные проблемы и вопросы технологии производства продукции общественного питания, животноводства и растениеводства: материалы III Всероссийской конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов и студентов. – Под редакцией профессора Набиевой А.Р. – Казань: Изд-во «Печать-сервис XXI век», 2020. – С. 87-91.

16. **Ли, Н.Г.** Исследование химического состава CO<sub>2</sub>-экстракта чаги (*Inonotus obliquus*) методом хромато-масс-спектрометрии / Н.Г. Ли, Т.К. Каленик, Е.В. Моткина // Актуальные вопросы развития производства пищевых продуктов: технологии, качество, экология, оборудование, менеджмент и маркетинг: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции, 20-21 февраля 2020 г. – ФГБОУ ВО Приморская ГСХА; отв. ред. С.В. Иншаков. – Уссурийск, 2020. – С. 135-142.

## Список сокращений и условных обозначений

АРА – антирадикальная активность

ОБЦ – относительная биологическая ценность

КЧ – кислотное число

ПЧ – перекисное число

ДРРН – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

**Благодарности.** Автор благодарен и признателен своему научному руководителю – д.б.н., профессору Татьяне Кузьминичне Каленик за помощь в обосновании научной концепции работы, директору Департамента пищевых наук и технологий Школы биомедицины – д.т.н., профессору Юрию Вадимовичу Приходько за внимание к работе и ценные советы и предложения, коллегам за оказанное содействие и критические замечания методического характера.