

УДК 577.13

ЭКСТРАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *CORDYCEPS MILITARIS* В УСЛОВИЯХ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© Д.В. Минаков^{1,2*}, Е.С. Саврасов¹, Н.Г. Базарнова¹, С.Л. Тихонов^{3,4}, Е.Ю. Егорова²

¹ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия, MinakovD-1990@yandex.ru

² Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, пр. Ленина, 46, Барнаул, 656038, Россия

³ Уральский государственный аграрный университет, ул. Карла Либкнехта, 42, Екатеринбург, 620000, Россия

⁴ Уральский государственный лесотехнический университет, Сибирский тракт, 37, Екатеринбург, 620100, Россия

Ультразвук как способ интенсификации процессов растворения и экстракции биологически активных веществ из разных видов растительного и животного сырья получил широкое применение в области прикладных научных исследований и различных сферах пищевых, фармацевтических и биотехнологических производств. Недостаточное количество научных данных об условиях и эффективности применения ультразвукового воздействия при выделении биологически активных соединений из биомассы мицелия *Cordyceps militaris* определило цель представленного исследования. Работа посвящена изучению процессов извлечения пигментов и полисахаридов гриба в режиме экстракции нагретой водно-этанольной смесью (20–80%об., 30–60 °С) под действием сгенерированного ультразвукового поля (мощность 150 Вт, частота 28 кГц). Биомассу мицелия штамма *Cordyceps militaris* GF-05 выращивали методом твердофазного культивирования на растительном субстрате (зерно пшеницы, белого, красного и бурого риса). Продолжительность экстракции в условиях обработки ультразвуком варьировали от 10 до 40 мин. Контроль содержания каротиноидов, полисахаридов и флавоноидов в сухих экстрактах оценивали спектрофотометрическим методом. Установлено, что применение подобранных рациональных параметров ультразвуковой экстракции (70%-ный раствор этанола, мощность и частота ультразвука 150 Вт и 28 кГц, температура 60 °С, продолжительность 30 мин, соотношение сырья к экстрагенту 1 : 50) позволяет получать экстракты с содержанием 1.63–3.22% каротиноидов, 13.45–17.65% полисахаридов и 19.90–30.56% флавоноидов, в зависимости от состава используемого растительного субстрата. Наибольшее содержание биологически активных соединений установлено в мицелии, выращенном на зерне бурого риса. Установлено, что при увеличении концентрации этанола с 20 до 70% происходит достоверное повышение перехода в экстракт сухих веществ (с 7.5 до 19.1%), дальнейшее увеличение концентрации этанола в экстрагенте снижает их растворимость и переход в экстракт. Экстракты, полученные из биомассы грибов *C. militaris*, характеризуются высоким содержанием биологически активных соединений и могут использоваться в качестве биологически активных ингредиентов в составе пищевых, фармацевтических продуктов и медицинских изделий.

Ключевые слова: ультразвук, экстракция, биологически активные вещества, *Cordyceps militaris*, биомасса мицелия, каротиноиды, полисахариды, флавоноиды.

Для цитирования: Минаков Д.В., Саврасов Е.С., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Егорова Е.Ю. Экстракция биологически активных соединений *Cordyceps militaris* в условиях ультразвукового воздействия // Химия растительного сырья. 2024. №2. С. 355–364. DOI: 10.14258/jcprm.20240214209.

Введение

Грибы рода *Cordyceps* традиционно используют в странах юго-восточной Азии в качестве компонента биологически активных пищевых добавок, обладающих адаптогенным, тонизирующим и иммуномодулирующим действием. Из 500 видов кордицепса большинство научных исследований посвящено *Cordyceps sinensis*, важнейшим компонентом которого считается кордицепин (аденозин), включенный в

* Автор, с которым следует вести переписку.

Государственную фармакопею Китая с 2015 года [1]. В связи с тем, что биотехнология производства *C. sinensis* относится к очень дорогостоящим, в последние годы внимание исследователей переключилось на вид *Cordyceps militaris* (кордицепс военный), который по биохимическому составу и физиологической активности имеет существенное сходство с *C. sinensis*. К настоящему времени из *C. militaris* выделен целый ряд биологически активных соединений (БАС) – кордицепин, полисахариды, эргостерин, маннит и аденозин, обладающие противоопухолевой, гепатопротекторной, противовоспалительной, антиоксидантной, противовирусной, нефропротективной и антиапоптотической активностью. Кроме вышеупомянутых БАС, в биомассе мицелия и плодовых телах (стромах) определены γ -аминомасляная кислота, эрготионеин, гликолипиды (цереброзиды), гликопротеины (лектины), кордицепиновая кислота, каротиноиды, включая ксантофиллы, стеролы (эргостерол), статины (ловастатин), фенольные соединения (включая фенолокислоты и флавоноиды), витамины и важные для обменных процессов микроэлементы – магний, калий, селен и сера [2].

Известно, что содержание различных классов БАС в биомассе мицелия *C. militaris* зависит, прежде всего, от условий культивирования. В свою очередь, эффективность выделения БАС зависит от используемого растворителя и примененного способа экстракции. К настоящему времени для извлечения БАС из биомассы высших грибов применялись различные способы – мацерация, перколяция, экстракция в аппарате Сокслета, ультразвуковая, микроволновая, суб- и сверхкритическая флюидная экстракция и др. [3, 4].

Известно, что ультразвуковая экстракция позволяет извлекать БАС с хорошим выходом при относительно невысоких температурах, меньших количествах растворителя и длительности процесса, способна обеспечить переход в экстракт веществ, не извлекаемых другими способами. На примере отдельных видов грибов пищевого и фармацевтического значения показано, что экстракция в условиях ультразвукового воздействия обеспечивает более быстрый и полный переход в экстракт флавоноидов [5–8], специфичных полисахаридов и тритерпеноидов [5, 9], сохраняя их антиоксидантную активность. Вопросы извлечения каротиноидов под действием ультразвука из высших грибов, в целом, не изучены. Однако на примере низших грибов и водорослей показано, что для эффективной экстракции каротиноидов достаточно средней мощности ультразвукового поля (частота 20–46 кГц и интенсивность 1.5–3.0 Вт/см²) и нагрева до 35–60 °С [10, 11]. Из хорошо известных каротиноидов в биомассе мицелия и плодовых тел *C. militaris* обнаружены ликопин и β -каротин с содержанием 0.277 и 0.328 мг/г [12] и именно эти каротиноиды в основном ответственны за характерный желто-оранжевый цвет плодовых тел кордицепса; есть данные как о более высоком, так и о более низком содержании данных каротиноидов. Кроме них в плодовых телах *C. militaris* обнаружено четыре специфичных для вида каротиноида – кордиксантины I, II, III и IV, составляющие более 80% от суммы всех каротиноидов *C. militaris* [13]. Кордиксантины как окисленные формы каротиноидов обладают более высокой растворимостью в воде из-за различий в химическом строении с широко распространенными в растительном сырье β -каротином, лютеином, зеаксантином и ликопином (последнего в составе каротиноидов кордицепса либо не обнаруживается, либо обнаруживается в пределах 5 мкг/г): они содержат меньше липофильных метильных групп и больше гидроксильных заместителей. Тем не менее наиболее высокая эффективность экстракции кордиксантинов достигается при использовании 50–70% водно-спиртовых растворов, обеспечивающих их извлечение свыше 1.1–1.2 мг/г грибного сырья суммарно [13, 14]. В ряду кордиксантинов наиболее существенные отличия в химическом строении имеет кордиксантин II: он представляет собой бицикл, состоящий из пятичленного и шестичленного колец, тогда как остальные кордиксантины состоят из двух шестичленных углеродных колец (рис. 1).

В отношении еще одной важной группы БАС кордицепса – флавоноидов – научные данные более противоречивы. Согласно обзору работ зарубежных авторов, содержание флавоноидов в плодовых телах и мицелии *C. militaris* составляет около 5.54 мг РЭ/г и 2.26 мг РЭ/г соответственно, но при этом в водном экстракте гриба концентрация флавоноидов определена на уровне 275.52 мг/г, то есть выше, чем в самих плодовых телах [2].

Обобщая литературные данные, можно отметить, что для *C. militaris* параметры эффективного извлечения комплекса БАС в условиях ультразвуковой обработки не исследованы. Таким образом, поиск рациональных параметров ультразвуковой экстракции БАС из биомассы ценного грибного сырья, к которому относится вид *C. militaris*, полностью отвечает целям и задачам современной стратегии развития агропромышленного комплекса и Доктрины продовольственной безопасности России, направленным на разработку и внедрение технологий глубокой переработки сырья и повышение эффективности использования ценных сырьевых ресурсов.

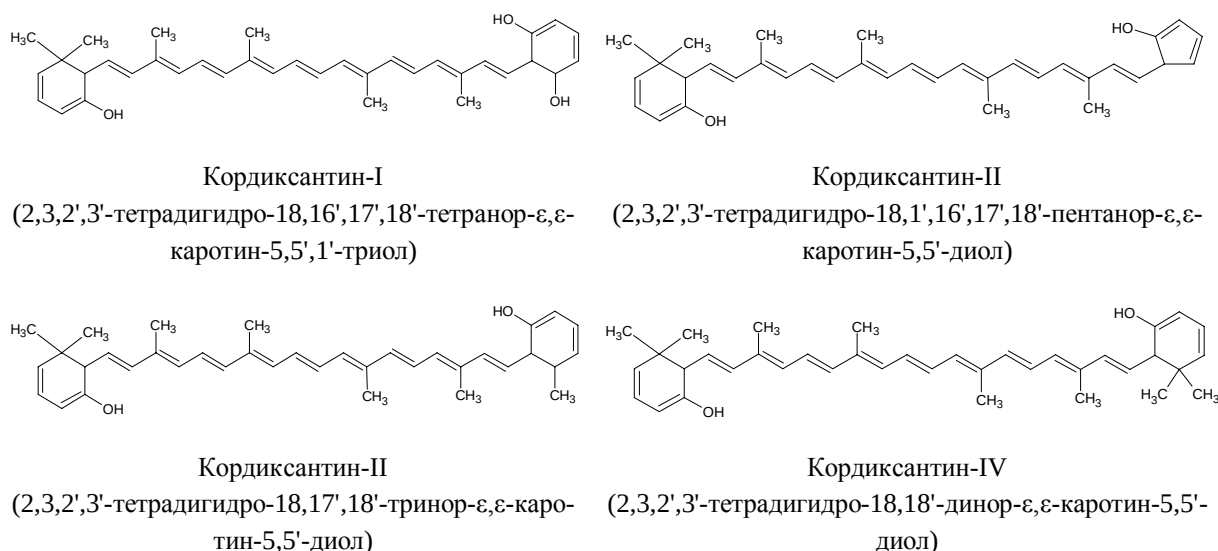


Рис. 1. Химическая структура четырех кордиксантинов [13]

Целью работы являлось исследование условий экстракции биологически активных соединений биомассы мицелия *Cordyceps militaris* в условиях ультразвукового воздействия.

Объекты и методы исследований

В исследованиях использован штамм *Cordyceps militaris* GF-05 (коллекция кафедры органической химии Алтайского государственного университета), который хранится в чашках Петри с сусло-агаром. Посевной мицелий получали глубинным культивированием, используя пивное сусло (4° по Баллингу) на шейкере-инкубаторе (ES-20 Biosan, КНР). Твердофазное культивирование мицелия проводили на зерне пшеницы, белого, красного и бурого риса в полипропиленовых контейнерах при 22 °C в течение 14 суток в темноте, с последующим выдерживанием при 16 °C в течение 21 суток при интенсивности освещения 1700 люкс в течение 12 ч и относительной влажности более 80%.

Выращенную биомассу мицелия высушивали при 40 °C в сушильном шкафу (ES-4610) и измельчали на лабораторной ножевой мельнице (Вибротехник РМ 120 380, Россия) до порошка с размером частиц 1–2 мм (рис. 2). Полученный порошок мицелия с субстратом подвергали экстракции.

Для определения рациональных параметров ультразвуковой экстракции БАС из *C. militaris* нами выбрана методика, предложенная в работе [15], с некоторыми изменениями: мощность и частота ультразвука 150 Вт и 28 кГц, при температуре 60 °C и продолжительности процесса 30 мин. Учитывая экспериментальные данные других авторов, исследование эффективности экстракции в условиях ультразвукового воздействия проводилось при гидромодуле 1 : 50, как обеспечивающем максимальное выделение БАС. В качестве объекта исследований использовали биомассу *C. militaris*, выращенную на буром рисе. Выбор данного субстрата обусловлен высокой скоростью роста мицелия и его наиболее ярко выраженным оранжевым цветом после застарения в отличие от других видов зерновых субстратов.

Рис. 2. Биомасса мицелия *C. militaris*, полученная на зерне риса и пшеницы: а – исходный образец *C. militaris*; измельченная в порошок биомасса мицелия с бурым (б), красным (в) рисом и пшеницей (г)

Навеску порошка биомассы мицелия заливали 20–80% этанолом в соотношении 1 : 50, помещали в ультразвуковую ванну (WUC-A03H, КНР) при заданной мощности и частоте. Продолжительность экстракции варьировали от 10 до 40 мин, в 4-кратной повторности. При экстрагировании подбирались оптимальные параметры: концентрация этанола в воде, температура и продолжительность процесса. Полученные извлечения концентрировали под вакуумом на ротационном испарителе (Heidolph Hei-VAP Advantage ML/G3, ФРГ) в 10 раз и высушивали в сушильном шкафу до воздушно-сухого состояния (остаточная влажность экстракта $6\pm 1\%$).

Определение содержания экстрактивных веществ проводили гравиметрическим методом, описанным в работе [16], полисахаридов – спектрофотометрическим методом с пикриновой кислотой в [17], определение суммы каротиноидов – по методике [18]. Количественное определение флавоноидов в экстрактах проводили спектрофотометрически по методу Фолина-Чокальтеу [19]. Оптическую плотность извлечений измеряли на спектрофотометре «Cary 60 UV-Vis» (Agilent Technologies, США).

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что основными факторами, влияющими на скорость и полноту экстракции БАВ из обрабатываемого сырья, являются способ экстракции, тип и концентрация экстрагента, степень измельчения сырья, соотношение сырья и экстрагента, температура и продолжительность экстракции.

Результаты многофакторного анализа технологических параметров процесса извлечения БАВ из биомассы грибов при ультразвуковой экстракции водно-этанольной смесью показывают, что температура, продолжительность экстракции и концентрация экстрагента являются более значимыми параметрами. В проведенных исследованиях соотношение сырья к экстрагенту составляло 1 : 50, что максимально способствовало усилению массопереноса и повышению растворимости БАС и их извлечению из клеток грибной биомассы [20–22].

Использование в качестве экстрагента водно-спиртовой смеси с различной концентрацией этанола позволяет в значительной степени увеличить выход БАС из грибной матрицы за счет избирательного растворения [15]. Следовательно, выбор наиболее подходящей концентрации этанола имеет решающее значение для улучшения эффективности экстракции. Установлено, что при увеличении концентрации этанола с 20 до 70% происходит достоверное повышение выхода экстрактивных веществ – с 7.5 до 19.1%, в то же время увеличение концентрации раствора этанола до 80% снижает их растворимость и переход в экстракт. Это может быть связано, прежде всего, с увеличением водой полярности этанола, в результате чего происходит извлечение большего количества БАС, имеющих полярные молекулы, например, полисахаридов или полифенолов. Содержание экстрактивных веществ, каротиноидов, полисахаридов и флавоноидов представлено в таблице 1.

Известно, что концентрация этанола в экстракционной смеси влияет на кинетику экстракции, при этом более высокая степень извлечения флавоноидов и каротиноидов растворами с более высокой долей спирта объясняется полярностью спирта [7]. В наших исследованиях при экстрагировании биомассы мицелия *S. militaris* наиболее рациональной концентрацией этанола следует считать 70%, в связи с наибольшим выходом экстрактивных веществ и суммарного содержания в них БАС. Дальнейшее определение рациональных значений температуры и времени экстракции проводили при концентрации этанола 70%.

Экстракция проводилась при температуре 60 °С в течение 30 мин. Повышение температуры во время обработки ультразвуком мощностью 150 Вт и частотой 28 кГц составляло 6 ± 2 °С, что в рамках проводимого эксперимента и влияния повышенных температур на структуру специфичных БАС кордицепса можно считать несущественным.

Установлено, что содержание каротиноидов (2.46–3.55%), полисахаридов (12.34–19.02%) и флавоноидов (21.42–30.54%) резко возрастает с повышением температуры экстракции с 30 до 60 °С при продолжительности процесса 40 мин, что обусловлено снижением вязкости растворителя и поверхностного натяжения, вызывающих высокое давление паров на грибной клеточной матрице. При температуре воздействия 45 °С выход исследуемых классов БАС был на 21, 25 и 16% ниже, чем при температуре 60 °С соответственно (табл. 2). Следовательно, во взятом интервале рациональной температурой ультразвуковой экстракции этих веществ из грибов *S. militaris* можно считать 60 °С.

Ранее, на примере экстракции флавоноидов из биомассы грибов 50% метанолом, было показано, что для их эффективного извлечения из грибов достаточной является мощность и продолжительность ультра-

звуковой обработки 300 Вт и 15 мин соответственно, 10 мин при той же мощности обработки не обеспечивает нужного эффекта [6]. При исследовании влияния продолжительности ультразвуковой обработки на эффективность экстракции БАС из *C. militaris* нами установлена прямолинейная корреляция извлечения каротиноидов и полисахаридов при увеличении продолжительности обработки от 10 до 40 мин, для флавоноидов – при увеличении времени обработки от 10 до 30 мин (после чего содержание флавоноидов в экстрактах больше не повышается). Максимальный выход каротиноидов (3.55%) и полисахаридов (19.02%) достигнут, соответственно, при экстракции 70%-ным этанолом в течение 40 мин, флавоноидов – (30.56%) за 30 мин; при этом содержание суммы каротиноидов и флавоноидов в полученных экстрактах, в целом, коррелирует с ранее опубликованными научными данными.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены оптимальные параметры ультразвуковой экстракции: экстрагент 70%-ный этанол, мощность и частота ультразвука 150 Вт и 28кГц, температура 60 °С, продолжительность процесса 30 мин, соотношение сырья к экстрагенту 1:50. Данные параметры позволяют получить извлечения из биомассы грибов *C. militaris* с высоким содержанием каротиноидов, полисахаридов и флавоноидов.

После выбора рациональных параметров ультразвуковой экстракции проведено исследование влияния ультразвукового воздействия на экстракцию БАС из биомассы мицелия грибов *C. militaris*, выращенной на разных видах зернового субстрата. В качестве контрольного способа экстракции для оценки эффективности ультразвука использована экстракция в аппарате Сокслета.

Согласно результатам проведенных исследований, наибольший выход суммы экстрактивных веществ из *C. militaris* достигнут при получении извлечений в аппарате Сокслета, для всех вариантов биомассы мицелия: на буром (23.1%), красном (19.3%), белом (12.9%) рисе и пшенице (24.6%). Это связано, прежде всего, с высокой температурой воздействия на грибное сырье (около 80 °С) и продолжительностью процесса экстракции (до 120 мин), предусмотренными стандартной методикой для данного способа экстракции. Наряду с этим при использовании 70%-ного раствора этилового спирта ультразвуковая экстракция обеспечивает повышение выхода каротиноидов, полисахаридов и флавоноидов по сравнению с экстракцией в аппарате Сокслета при аналогичной концентрации спирта (табл. 3). При этом переход в экстракт суммы сухих веществ в условиях ультразвуковой обработки составил 19.1, 14.2, 10.2 и 18.2% на буром, красном, белом рисе и пшенице соответственно. При разном содержании БАС в получаемых экстрактах сумма сухих веществ в них находится на приблизительно равном уровне. Это можно объяснить тем, что температура экстракции играет важную роль в извлечении не только рассматриваемых компонентов, но и более термолабильных веществ, частично разрушающихся с повышением температуры либо переходящим в менее растворимые формы – белков, глюканов и ряда других.

Таблица 1. Биохимический состав сухих экстрактов из *C. militaris*, полученных в условиях ультразвукового воздействия (n=4)

Концентрация этанола	Содержание компонентов в экстракте, %			
	Каротиноиды	Полисахариды	Флавоноиды	Сумма сухих веществ
20	0.98±0.12	19.46±1.11	19.90±2.71	93.18±0.18
40	1.20±0.11	18.62±2.21	22.12±1.66	93.82±0.12
60	2.50±0.14	18.24±1.70	25.46±1.25	94.21±0.16
70	3.21±0.18	17.65±1.20	30.54±2.28	94.56±0.17
80	3.22±0.12	12.71±1.12	30.62±1.14	94.86±0.14

Таблица 2. Содержание БАС в извлечениях из грибов *C. militaris* в зависимости от температуры и времени экстракции 70% этанолом в условиях ультразвукового воздействия (n=4)

Параметры экстракции		Температура, °С								
		30			45			60		
		Содержание БАС в экстрактах, %								
		К	П	Ф	К	П	Ф	К	П	Ф
Время, мин	10	1.50±0.12	8.24±1.12	15.21±2.24	1.85±0.12	9.26±2.32	18.61±2.52	2.18±0.16	12.52±1.61	22.12±2.21
	20	1.90±0.14	9.46±1.80	18.23±2.00	2.18±0.14	10.72±1.20	22.00±2.21	2.70±0.15	14.98±1.40	26.01±2.82
	30	2.24±0.20	11.22±1.80	23.61±1.92	2.60±0.17	12.54±2.21	28.11±2.21	3.22±0.18	17.65±1.22	30.56±2.31
	40	2.46±0.18	12.34±1.41	21.42±2.12	2.80±0.15	14.02±2.10	25.52±2.62	3.55±0.19	19.02±1.60	30.54±2.28

Примечание: К – каротиноиды, П – полисахариды (по глюкозе), Ф – флавоноиды.

Таблица 3. Содержание БАС в экстрактах из *C.militaris* (n=4)

Вид субстрата	Содержание компонентов в экстрактах, %			
	Каротиноиды	Полисахариды	Флавоноиды	Сумма сухих веществ
Экстракция в аппарате Сокслета, 80 °С				
Бурый рис	2.73±0.20	15.11±2.80	25.98±1.12	94.24±0.12
Красный рис	2.71 ±0.18	14.08±1.91	23.08±1.24	94.51±0.11
Белый рис	1.41±0.12	11.43±1.60	16.83±2.24	94.82±0.15
Пшеница	2.63±0.19	12.72±1.12	22.58±1.42	94.90±0.16
Ультразвуковая экстракция, 60 °С				
Бурый рис	3.22±0.17	17.65±1.22	30.56±2.28	94.56±0.12
Красный рис	3.19 ±0.18	16.34±2.10	27.26±1.02	94.22±0.14
Белый рис	1.63±0.10	13.45±1.21	19.90±2.71	94.30±0.11
Пшеница	2.97±0.14	13.67±1.40	26.34±1.25	94.44±0.17

Одним из наиболее ценных классов БАС *C. militaris* считаются каротиноиды [2, 13]. Многие растительные каротиноиды обладают высокой физиологической активностью и используются в качестве биологически активных ингредиентов в пищевой, косметологической и фармацевтической отрасли. Грибы *C. militaris* являются богатым источником каротиноидов, причем их количественное содержание в мицелиальной биомассе выше, чем в большинстве других видов съедобных грибов: таких как *Agaricus bisporus* 0.04 мг/г, *Pleurotus* – 0.03 мг/г, *Tricholoma acerbum* – 75.48 мкг/г грибной биомассы при содержании ликопина 39.65 мкг/г. Известно, что более интенсивный синтез и накопление каротиноидов в *C. militaris* протекают при освещенности до 6000 лк. Освещенность выше этого значения приводит к ингибированию биосинтеза каротиноидов как в мицелии, так и в плодовых телах *C. militaris*. Благоприятному синтезу каротиноидов также способствует повышение температуры до 25 °С после зарастания мицелием зернового субстрата [2].

В результате проведенных исследований установлено высокое содержание каротиноидов в извлечениях, полученных в условиях воздействия ультразвука (до 3.55%). Максимум извлечения каротиноидов достигнут при обработке биомассы *C. militaris*, выращенной на зерне бурого риса. В целом, можно отметить, что применение ультразвука, по сравнению с установкой Сокслета, позволяет сократить продолжительность процесса экстракции со 120 до 30 мин и получить извлечения из биомассы *C. militaris* на буром, красном, белом рисе и пшенице с содержанием каротиноидов выше на 17.9, 17.7, 15.6 и 10.6% соответственно. Таким образом, экстракты из биомассы грибов *C. militaris* содержат значительное количество каротиноидов и могут использоваться в качестве биологически активных ингредиентов для производства определенных пищевых или фармацевтических продуктов и медицинских изделий, в частности, – ранозаживляющих материалов.

Не менее эффективно применение ультразвука отразилось на извлечении полисахаридов. Известно, что полисахариды *C. militaris* включают десять моносахаридов – рамнозу, рибозу, арабинозу, ксилозу, маннозу, глюкозу, галактозу, манниту, фруктозу и сорбозу [23]. Физиологическая активность грибных полисахаридов коррелирует с их физико-химическими свойствами. В частности, высокая молекулярная масса (более 1600 кДа) определяет противоопухолевые, противовирусные и антиоксидантные свойства [24]. Количественное содержание полисахаридов в экстрактах из биомассы грибов *C. militaris*, выращенной на зерновых субстратах из риса и пшеницы, составляет от 11.43 до 17.62%. Наиболее высокое их содержание установлено в извлечениях из бурого риса. Объяснением этому может быть как более высокое исходное содержание крахмала в буром рисе (до 76%), гидролизующем в ходе экстракции, так и метаболические потребности гриба в источниках питания и более сбалансированный биохимический состав бурого риса, благодаря чему обеспечивается биосинтез мицелием гриба *C. militaris* большого количества полисахаридов. Установлено незначительное отличие по содержанию полисахаридов в составе извлечений при экстрагировании в аппарате Сокслета и в условиях обработки в ультразвуковом поле. Однако ультразвуковая экстракция реализуется в более «мягких» условиях – температура 60 °С, продолжительность экстракции 30 мин, в отличие от аппарата Сокслета, в котором экстракцию проводят в течение 120 мин. Таким образом, использование ультразвука в значительной степени сокращает процесс перехода в экстракт и полисахаридов.

Важными классами фенольных соединений гриба *C. militaris* являются фенолокислоты и флавоноиды. Биологический потенциал этих веществ связан с выраженным антиоксидантным действием и обусловленной этим способностью защищать от окислительного повреждения такие важные биологические объекты, как белки, ферменты, липиды и нуклеиновые кислоты. Сильными антиоксидантными свойствами об-

ладают флавоноиды. Обнаруженные в *C. militaris* пара-гидроксibenзойная, галловая и протокатеховая кислоты не только проявляют антиоксидантную активность, но также оказывают антибактериальное, противогрибковое, противовирусное и противовоспалительное действие, что продемонстрировано в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [19]. Суммарное содержание флавоноидов в извлечениях составляет от 16.83 до 30.56%. Больше их количество установлено в извлечениях, полученных в ультразвуковых условиях из *C. militaris*, выращенном на буром рисе. Содержание флавоноидов в ультразвуковых извлечениях из биомассы *C. militaris*, выращенной на зерне пшеницы, составило 26.34%. При ультразвуковой экстракции в сравнении с аппаратом Сокслета наблюдается увеличение степени извлечения флавоноидов на 17.6% (бурый рис), 15.3% (красный рис), 18.2% (белый рис) и 16.6% (пшеница).

Заключение

Исследован биохимический состав сухих экстрактов, полученных в условиях обработки ультразвуком биомассы мицелия *C. militaris*, выращенной на зерновых субстратах. Установлено, что оптимальным растительным субстратом для культивирования *C. militaris* с целью последующего получения экстрактов с высоким содержанием каротиноидов (до 3.22%), полисахаридов (до 17.65%) и флавоноидов (до 30.56%) является бурый рис. Следовательно, соотношение БАС в экстрактах из *C. militaris* зависит не только от способа экстракции, но и от состава используемого для выращивания мицелия растительного субстрата.

Обоснованы рекомендуемые параметры извлечения БАС из биомассы мицелия *C. militaris* в условиях ультразвукового поля. Воздействие мощностью 150 Вт с частотой 28 кГц в водном растворе 70% этанола позволяет снизить температуру обработки до 60 °С и обеспечивает уменьшение продолжительности экстракции БАС в 6 раз по сравнению с экстракцией в аппарате Сокслета. При этом выход каротиноидов, полисахаридов и флавоноидов в сухих экстрактах, полученных в ультразвуковых условиях обработки, выше на 17.9, 16.8, 17.6% (бурый рис), 17.7, 16.0, 15.3% (красный рис), 15.6, 17.6, 18.2% (белый рис) и 10.6, 7.5, 16.6% (пшеница) соответственно.

Финансирование

Авторы благодарят за финансовую поддержку Минобрнауки РФ (ГЗ № 075-03-2024-105, тема № FZMM-2024-0003, рег. № НИОКТР 124013000666-5).

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Liu Y., Wang J., Wang W., Zhang H., Zhang X., Han C. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis* // Evid Based Complement Alternat Med. 2015. Vol. 2015. 575063. DOI: 10.1155/2015/575063.
2. Jędrejko K.J., Lazur J., Muszyńska B. *Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity // Foods. 2021. Vol. 10, no. 11. 2634. DOI: 10.3390/foods10112634.
3. Sharpe E., Farragher-Gnadt A., Igbunugo M., Huber T., Michelotti J., Milenkowic A., Ludlam S., Hanes W., Bradley R., Bou-Abdallah F. Comparison of antioxidant activity and extraction techniques for commercially and laboratory prepared extracts from six mushroom species // Journal of agriculture and food research. 2021. Vol. 4. 100130. DOI: 10.1016/j.jafr.2021.100130.
4. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang a X., Liu N., Zhao Y., Wang J., Chen X. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides // Carbohydrate Research. 2020. Vol. 494. 108037. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108037.
5. Zheng S., Zhang W., Liu S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their in vitro antioxidant capacities // PLOS ONE. 2020. Vol. 15, no. 12. e0244749. DOI: 10.1371/journal.pone.0244749.
6. Mousavi R.S., Nateghi L., Soltani M., Asgarpanah J. Optimization of the phenolics and antioxidants extraction from *Ganoderma Lucidum* using ultrasound method // Chemistry and chemical engineering. 2022. Vol. 41, no. 114. Pp. 1275–1287. DOI: 10.30492/IJCCE.2021.137539.4362.

7. Aliaño-González M., Barea-Sepúlveda M., Espada-Bellido E., Ferreiro-González M., Palma M., Barbero G., Carrera C. Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Mushrooms // *Agronomy*. 2022. Vol. 12. 1812. DOI: 10.3390/agronomy12081812.
8. Dong-Bao H., Rui X., Xiao-Cui Z., Xin-Sha Z., Sheng-Li S. Ultrasound-assisted extraction optimization of polyphenols from *Boletus bicolor* and evaluation of its antioxidant activity // *Frontiers in Nutrition*. 2023. Vol. 10. 1135712. DOI: 10.3389/fnut.2023.1135712.
9. Aguiló-Aguayo I., Walton J., Viñas I., Tiwari B.K. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products // *LWT – Food Science and Technology*. 2017. Vol. 77. Pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.043.
10. Avdeenko A., Belova E., Dašić P., Konovalova S., Baklanova L., Krstić S., Milosavljević M. Efficient two-frequency ultrasound extraction of β -carotene from the fungus *Blakeslea trispora* // *Hemijska industrija*. 2016. Vol. 71. Pp. 329–336. DOI: 10.2298/HEMIND151110043A.
11. Abbas K.M., Nawras S.S. Ultrasound assisted extraction of carotenoids from *Sargassum angustifolium* algae // *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*. 2022. Vol. 10, no. 2. Pp. 445–454. DOI: 10.21533/pen.v10i2.2776.
12. Joshi M., Sagar A., Kanwar S.S., Singh S. Anticancer, antibacterial and antioxidant activities of *Cordyceps militaris* // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2019. Vol. 57. Pp. 15–20.
13. Jing Z., Shui H., Lan Y., Zi W., Wang Y., Wang Q. Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies // *Journal of Functional Foods*. 2013. Vol. 5, no. 3. Pp. 1450–1455. DOI: 10.1016/j.jff.2013.06.002.
14. Choi E., Park B., Lee J., Kim J. Anti-atopic dermatitis properties of *Cordyceps militaris* on TNF α /IFN γ -stimulated HaCaT cells and experimentally induced atopic dermatitis in mice // *Phys Act Nutr*. 2020. Vol. 24. Pp. 7–14. DOI: 10.20463/pan.2020.0022.
15. Wang H., Pan M., Chang C., Chang S., Hsieh C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* using orthogonal experimental design // *Molecules*. 2014. Vol. 19, no. 12. Pp. 20808–20820. DOI: 10.3390/molecules191220808.
16. ОФС.1.5.3.0006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. М., 2015. Т. 1.
17. ОФС.1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом // Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М., 2018. Т. 1.
18. ГОСТ Р 54058-2010. Продукты пищевые функциональные. Метод определения каротиноидов. М., 2019. 13 с.
19. Marsup P., Yeerong K., Neimkhum W., Sirithunyalug J., Anuchapreeda S., To-anun C., Chaiyana W. Enhancement of Chemical Stability and Dermal Delivery of *Cordyceps militaris* Extracts by Nanoemulsion // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, no. 8. 1565. DOI: 10.3390/nano10081565.
20. Sunarwidhi A.L., Hernawan A., Frediansyah A., Widyastuti S., Abidin A.S., Padmi H., Handayani E., Utami P. Multivariate analysis revealed ultrasonic-assisted extraction improves anti-melanoma activity of non-flavonoid compounds in Indonesian brown algae ethanol extract // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 21. 7509. DOI: 10.3390/molecules27217509.
21. Umaña M., Eim V., Garau C., Rosselló C., Simal S. Ultrasound-assisted extraction of ergosterol and antioxidant components from mushroom by-products and the attainment of a β -glucan rich residue // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 332. 127390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127390.
22. Valu M., Soare L., Sutan N., Ducu C., Moga S., Hritcu L., Boiangiu R., Carradori S. Optimization of ultrasonic extraction to obtain erinacine A and polyphenols with antioxidant activity from the fungal biomass of *Hericiumerinaceus* // *Foods*. 2020. Vol. 9, no. 12. 1889. DOI: 10.3390/foods9121889.
23. Dong Y., Hu S., Liu C., Meng Q., Song J., Lu J., Teng L. Purification of polysaccharides from *Cordyceps militaris* and their anti-hypoxic effect // *Molecular Medicine Reports*. 2014. Vol. 11, no. 2. Pp. 1312–1317. DOI: 10.3892/mmr.2014.2786.
24. Kanlayavattanukul M., Lourith N. *Cordyceps militaris* polysaccharides: preparation and topical product application // *Fungal Biology and Biotechnology*. 2023. Vol. 10. Article 3. DOI: 10.1186/s40694-023-00150-5.

Поступила в редакцию 2 декабря 2023 г.

После переработки 9 марта 2024 г.

Принята к публикации 11 марта 2024 г.

Minakov D.V.^{1,2*}, Savrasov E.S.¹, Bazarnova N.G.¹, Tikhonov S.L.^{3,4}, Egorova E.Yu.² EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM CORDYCEPS MILITARIS UNDER ULTRASONIC CONDITIONS

¹Altai State University, Lenina av., 61, Barnaul, 656049, Russia, MinakovD-1990@yandex.ru

²Altai State Technical University named after I.I. Polzunova, Lenina av., 46, Barnaul, 656038, Russia

³Ural State Agrarian University, Karla Liebknechta st., 42, Ekaterinburg, 620000, Russia

⁴Ural State Forest Engineering University, Sibirskiy trakt, 37, Ekaterinburg, 620100, Russia

Ultrasound, as a method of intensifying the processes of dissolution and extraction of biologically active substances from various types of plant and animal raw materials, has been widely used in the field of applied scientific research and various areas of food, pharmaceutical and biotechnological production. The insufficient amount of scientific data on the conditions and effectiveness of the use of ultrasound in the isolation of biologically active compounds from the biomass of *Cordyceps militaris* mycelium determined the purpose of the presented study. The work is devoted to the study of the processes of extraction of fungal pigments and polysaccharides in the extraction mode with a heated water-ethanol mixture (20–80% vol., 30–60 °C) under the influence of a generated ultrasonic field (power 150 W, frequency 28 kHz). Mycelial biomass of the *Cordyceps militaris* strain GF-05 was grown by solid-phase cultivation on a plant substrate (wheat grain, white, red and brown rice). The duration of extraction under sonication conditions varied from 10 to 40 minutes. The control of the content of carotenoids, polysaccharides and flavonoids in dry extracts was assessed by spectrophotometric method. It has been established that the use of selected rational parameters of ultrasonic extraction (70% ethanol solution, ultrasonic power and frequency 150 W and 28 kHz, temperature 60 °C, duration 30 min, raw material to extractant ratio 1 : 50) makes it possible to obtain extracts containing 1.63–3.22% carotenoids, 13.45–17.65% polysaccharides and 19.90–30.56% flavonoids, depending on the composition of the plant substrate used. The highest content of biologically active compounds was found in mycelium grown on brown rice grains. It was found that when the ethanol concentration increases from 20 to 70%, there is a significant increase in the transfer of dry substances into the extract (from 7.5 to 19.1%), a further increase in the ethanol concentration in the extractant reduces their solubility and transfer into the extract. Extracts obtained from the biomass of the fungi *C. militaris* are characterized by a high content of biologically active compounds and can be used as biologically active ingredients in food, pharmaceutical products and medical devices.

Keywords: ultrasound, extraction, biologically active substances, *Cordyceps militaris*, mycelium biomass, carotenoids, polysaccharides, flavonoids.

For citing: Minakov D.V., Savrasov E.S., Bazarnova N.G., Tikhonov S.L., Egorova E.Yu. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 2, pp. 355–364. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240214209.

References

1. Liu Y., Wang J., Wang W., Zhang H., Zhang X., Han C. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2015, vol. 2015, 575063. DOI: 10.1155/2015/575063.
2. Jędrejko K.J., Lazur J., Muszyńska B. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 11, 2634. DOI: 10.3390/foods10112634.
3. Sharpe E., Farragher-Gnadt A., Igbunugo M., Huber T., Michelotti J., Milenkovic A., Ludlam S., Hanes W., Bradley R., Bou-Abdallah F. *Journal of agriculture and food research*, 2021, vol. 4, 100130. DOI: 10.1016/j.jafr.2021.100130.
4. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang X., Liu N., Zhao Y., Wang J., Chen X. *Carbohydrate Research*, 2020, vol. 494, 108037. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108037.
5. Zheng S., Zhang W., Liu S. *PLOS ONE*, 2020, vol. 15, no. 12, e0244749. DOI: 10.1371/journal.pone.0244749.
6. Mousavi R.S., Nateghi L., Soltani M., Asgarpanah J. *Chemistry and chemical engineering*, 2022, vol. 41, no. 114, pp. 1275–1287. DOI: 10.30492/IJCCE.2021.137539.4362.
7. Aliaño-González M., Barea-Sepúlveda M., Espada-Bellido E., Ferreira-González M., Palma M., Barbero G., Carrera C. *Agronomy*, 2022, vol. 12, 1812. DOI: 10.3390/agronomy12081812.
8. Dong-Bao H., Rui X., Xiao-Cui Z., Xin-Sha Z., Sheng-Li S. *Frontiers in Nutrition*, 2023, vol. 10, 1135712. DOI: 10.3389/fnut.2023.1135712.
9. Aguiló-Aguayo I., Walton J., Viñas I., Tiwari B.K. *LWT – Food Science and Technology*, 2017, vol. 77, pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.043.
10. Avdeenko A., Belova E., Dašić P., Konovalova S., Baklanova L., Krstic S., Milosavljević M. *Hemjska industrija*, 2016, vol. 71, pp. 329–336. DOI: 10.2298/HEMIND151110043A.
11. Abbas K.M., Nawras S.S. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 2022, vol. 10, no. 2, pp. 445–454. DOI: 10.21533/pen.v10i2.2776.
12. Joshi M., Sagar A., Kanwar S.S., Singh S. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2019, vol. 57, pp. 15–20.
13. Jing Z., Shui H., Lan Y., Zi W., Wang Y., Wang Q. *Journal of Functional Foods*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 1450–1455. DOI: 10.1016/j.jff.2013.06.002.
14. Choi E., Park B., Lee J., Kim J. *Phys. Act. Nutr.*, 2020, vol. 24, pp. 7–14. DOI: 10.20463/pan.2020.0022.
15. Wang H., Pan M., Chang C., Chang S., Hsieh C. *Molecules*, 2014, vol. 19, no. 12, pp. 20808–20820. DOI: 10.3390/molecules191220808.
16. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF. XIII izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed.]. Moscow, 2015, vol. 1. (in Russ.).
17. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 1. (in Russ.).

* Corresponding author.

18. GOST R 54058-2010. *Produkty pishchevyye funktsional'nyye. Metod opredeleniya karotinoidov*. [GOST R 54058-2010. Functional food products. Method for determination of carotenoids]. Moscow, 2019, 13 p. (in Russ.).
19. Marsup P., Yeerong K., Neimkhun W., Sirithunyalug J., Anuchapreeda S., To-anun C., Chaiyana W. *Nanomaterials*, 2020, vol. 10, no. 8, 1565. DOI: 10.3390/nano10081565.
20. Sunarwidhi A.L., Hernawan A., Frediansyah A., Widyastuti S., Abidin A.S., Padmi H., Handayani E., Utami P. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 21, 7509. DOI: 10.3390/molecules27217509.
21. Umaña M., Eim V., Garau C., Rosselló C., Simal S. *Food Chemistry*, 2020, vol. 332, 127390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127390.
22. Valu M., Soare L., Sutan N., Ducu C., Moga S., Hritcu L., Boianu R., Carradori S. *Foods*, 2020, vol. 9, no. 12, 1889. DOI: 10.3390/foods9121889.
23. Dong Y., Hu S., Liu C., Meng Q., Song J., Lu J., Teng L. *Molecular Medicine Reports*, 2014, vol. 11, no. 2, pp. 1312–1317. DOI: 10.3892/mmr.2014.2786.
24. Kanlayavattanakul M., Lourith N. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2023, vol. 10, article 3. DOI: 10.1186/s40694-023-00150-5.

Received December 2, 2023

Revised March 9, 2024

Accepted March 11, 2024

Сведения об авторах

Минаков Денис Викторович – кандидат биологических наук, доцент кафедры органической химии, MinakovD-1990@yandex.ru

Саврасов Евгений Сергеевич – аспирант, инженер кафедры органической химии, savrasovbti@mail.ru

Базарнова Наталья Григорьевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой органической химии, bazarnova@chem.asu.ru

Тихонов Сергей Леонидович – доктор технических наук, профессор, tihonov75@bk.ru

Егорова Елена Юрьевна – доктор технических наук, доцент, заведующая кафедрой технологии хранения и переработки зерна, egorovaeyu@mail.ru

Information about authors

Minakov Denis Viktorovich – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Organic Chemistry, MinakovD-1990@yandex.ru

Savrasov Evgeniy Sergeevich – graduate student, engineer of the Department of Organic Chemistry, savrasovbti@mail.ru

Bazarnova Natalya Grigorievna – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, bazarnova@chem.asu.ru

Tikhonov Sergey Leonidovich – Doctor of Technical Sciences, Professor, tihonov75@bk.ru

Egorova Elena Yuryevna – Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Grain Storage and Processing Technology, egorovaeyu@mail.ru