

Оригинальная статья / Original article
УДК 15.012.6: 615.339: 579.017.8: 579.24
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-95-106>

Выделение штамма *Inonotus obliquus* и интенсификация роста культуры при твердофазном культивировании

© М.А. Сысоева, Л.Н. Уразлина, В.Р. Хабибрахманова, Т.В. Григорьева, Е.В. Сысоева

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: В настоящее время повысился спрос на извлечения из гриба *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (чага), которые широко используют в медицине и косметике благодаря их высоким антиоксидантным свойствам. Поскольку природные ресурсы этого гриба ограничены, актуален поиск новых высокопродуктивных штаммов *Inonotus obliquus* и разработка способов его культивирования с накоплением им высоких концентраций основного действующего компонента – меланина. Целью настоящего исследования являлось выделение нового штамма *Inonotus obliquus* из природной чаги, введение его в культуру с регистрацией в международной базе данных, определение оптимальной среды культивирования для его лучшего роста и накопления меланинов с высокими антиоксидантными свойствами. Выделен новый штамм гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728. Для его роста подобрана агаризованная питательная среда. Показано, что *Inonotus obliquus* SUB2092728 имеет максимальную скорость роста 2,18 мм/сут. на глюкозо-картофельной среде с началом пигментации на 8-е сутки роста. Введение в среду лекарственного препарата полифепан, содержащего гидролизованный лигнин, позволило интенсифицировать рост гриба и увеличить скорость его роста до 3,60 мм/сут. Установлено, что полученные меланины отличаются от меланина природной чаги меньшей степенью ароматичности, более высокой степенью алифатичности и проявляют антиоксидантные свойства на 16 % выше по сравнению с природным меланином, что позволит использовать их для разработки биологически активных добавок с антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: *Inonotus obliquus*, твердофазное культивирование, питательные среды, лигнин, биомасса, меланин, антиоксидантные свойства

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках федеральной программы УМНИК «Хелснет НТИ», учрежденной Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Госконтракт № 13182ГУ/2018 от 31.05.2018 г. Тема НИОКР: «Разработка биотехнологии получения меланина».

Информация о статье: Дата поступления 13 октября 2019 г.; дата принятия к печати 25 февраля 2020 г.; дата онлайн-размещения 31 марта 2020 г.

Для цитирования: Сысоева М.А., Уразлина Л.Н., Хабибрахманова В.Р., Григорьева Т.В., Сысоева Е.В. Выделение штамма *Inonotus obliquus* и интенсификация роста культуры при твердофазном культивировании. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 1. С. 95–106. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-95-106>

Isolation of the *Inonotus obliquus* chaga mushroom strain and intensification of a culture growth during solid-phase cultivation

Maria A. Sysoeva, Lyaysyan N. Urazlina, Venera R. Khabibrakhmanova,
Tatyana V. Grigoryeva, Elena V. Sysoeva

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract: The extracts from fungus *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat (chaga), which have been widely used in medicine and cosmetics due to their high antioxidant properties, are in evergrowing demand currently. Since fungus natural resources are limited, the search for new highly productive *Inonotus obliquus* strains and the methods for its cultivation development with the high production ability of the main active component – melanin, are relevant. The aim of the present study was to isolate a new *Inonotus obliquus* strain from natural chaga, introduce it into a standard culture registered in an international database, as well as determine the optimal cultivation environment for the procurement of melanins with high antioxidant properties. A new strain of the fungus *Inonotus obliquus* SUB2092728 was isolated. For its growth, an agar nutrient medium was selected. It was shown that *Inonotus obliquus* SUB2092728 has a maximum growth rate of 2.18 mm/day in a glucose-potato medium with the onset of pigmentation on the 8th day of growth. The introduction of the hydrolysed lignin-containing drug Polyphepan into the environment made it possible to intensify the growth of the fungus and increase its growth rate up to 3.60 mm/day. It was established that the obtained melanins differ from the natural chaga melanin in terms of a lower degree of aromaticity and a higher degree of aliphaticity, as well as exhibiting antioxidant properties 16 % higher than natural melanin, making them suitable for use in the development of biologically active additives having antioxidant properties.

Keywords: *Inonotus obliquus*, solid-phase cultivation, growth media, lignin, biomass, melanin, antioxidant properties

Acknowledgements: The work was performed under the Russian Federation Ministry of Education and Science financial support within the federal program UMNİK «Helsnet NTI» produced by the «Fund for the Small Forms of Enterprises Promotion Development in the Scientific and Technical Sphere». The State contract N 13182GU/2018 dated 05.31.2018. R&D theme: «Development of biotechnology for obtaining melanin».

Information about the article: Received October 13, 2019; accepted for publication February 25, 2020; available online March 31, 2020.

For citation: Sysoeva MA, Urazlina LN, Khabibrakhmanova VR, Grigoryeva TV., Sysoeva EV. Isolation of the *Inonotus obliquus* chaga mushroom strain and intensification of a culture growth during solid-phase cultivation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2020;10(1):95–106. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-95-106>

ВВЕДЕНИЕ

Березовый гриб *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat – чага, и экстракты на его основе широко применяют в терапии и профилактике желудочно-кишечных, онкологических и ряда других заболеваний [1–5]. Среди метаболитов, которые чага накапливает в процессе естественного роста на березе, наибольшую фармацевтическую ценность представляет меланин. Известно, что он является активным действующим компонентом ряда лекарственных средств, в том числе бефунгина [5, 6]. Рост гриба в природных условиях и накопление им целевых продуктов происходит в течение длительного периода времени – более 4–5 лет [7]. В связи с этим актуальной задачей является поиск и выделение новых высокопродуктивных штаммов гриба *Inonotus obliquus* в культуру, а также подбор субстратов, которые позволят обеспечить более высокие показатели роста и наибольшее накопление меланина.

В настоящее время известно большое количество штаммов *Inonotus obliquus*, используемых для выделения из них меланина и других биологически активных веществ (БАВ) [8–18]. Выход меланина при культивировании различных штаммов на агаризованных средах в течение

30–35 дней составляет 5,9–13,8 % от биомассы гриба [19].

Цель работы: выделить из природной чаги, ввести в культуру, зарегистрировать в международной базе данных новый штамм *Inonotus obliquus* и выявить среды с различными источниками углеводов и лигнина для его лучшего роста и накопления им меланинов с высокими антиоксидантными свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение культуры Inonotus obliquus.

Плодовые тела чаги были собраны в республике Марий Эл, Россия. Выделение чистой культуры проводили тканевым методом [20]. Для устранения контаминации плодовые тела чаги перед посевом на питательную среду обрабатывали дезинфицирующим раствором – 0,5 % перманганата калия. Культивирование проводили на агаризованной среде при температуре 27±2 °С в течение 10 суток. Хранили культуру при температуре 4±2 °С, пересеивали каждые 3 месяца.

Идентификация домена ITS. Определение первичных нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера¹.

¹ Соловьева В.В., Мороз А.Р., Ризванов А.А., Сабиров Р.М. Молекулярно-генетический анализ беспозвоночных животных по нуклеотидной последовательности гена 18S рибосомной РНК: учеб. пособие. Казань: Изд-во Казанского федерального ун-та, 2011. 52 с.

Постановку сиквенсной реакции проводили с использованием ген-специфических праймеров ITS1 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) и ITS4 (5-TCCTCCGTTATTGATATGC-3), а также набора реактивов Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Использовали 2–5 мкл очищенного ПЦР-продукта в количестве от 10 до 50 нг, в зависимости от длины ПЦР-продукта, добавляли 1 мкл 3,2 пико Моль праймера, 0,8 мкл Ready Reaction Mix, 1,6 мкл 5X Sequencing Buffer и воду до объема 10 мкл. Для подтверждения мутации прочтение осуществляли с обоих праймеров (прямого и обратного). Реакцию проводили с использованием амплификатора Veriti (Applied Biosystems, США) по следующему температурному протоколу: предварительная денатурация при 96 °С – 1 мин; 26 циклов при 96 °С по 10 с, 50 °С – 5 с, 60 °С – 4 мин. Секвенирование продуктов ПЦР осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США) на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета.

Подбор питательной среды для культивирования. Штамм *Inonotus obliquus* SUB2092728 выращивали в чашках Петри на глюкозо-картофельной агаризованной (ГКА) среде при температуре 27±2 °С в течение 5–7 дней. Затем из зоны роста культуры вырезали высечку диаметром 5–9 мм и помещали ее в центр чашки Петри со средой другого состава:

1) глюкозо-пептонная агаризованная (ГПА) среда. Состав, г/л: глюкоза – 30,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 2,0; КН₂Р₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,5; объем доведен до 1 л [21];

2) овсяный отвар агаризованный (ООВА). Зерна овса массой 30 г помещали в 970 мл водопроводной воды, кипятили в течение 1 ч, настаивали 12–15 ч, фильтровали. Фильтрат доводили до 1 л добавлением к нему 20 г агара [20];

3) ГКА среда. Картофель массой 200 г измельчали и варили 30 мин в 1 л воды, фильтровали. Фильтрат доводили до объема 1 л водой и добавляли к нему 20 г глюкозы и 20 г агара [20].

Культивирование штамма *Inonotus obliquus* SUB2092728 на всех средах проводили при температуре 27±2 °С в течение 30 суток.

Подготовка лигнинсодержащих добавок. Полифепан – лекарственный препарат, состоящий из гидролизованного лигнина древесины, растирали в ступке и вносили в среду в количестве 0,1 и 1,0 г/л. Кору дуба измельчали до размера частиц меньше 0,85 мм (20 mesh), добавляли воду в соотношении 1:10, кипятили в течение 15 мин и фильтровали. Полученный отвар коры дуба вносили в среду в количестве 1 мл. Древесину березы измельчали до размера частиц меньше 0,85 мм (20 mesh) и вносили в среду в количестве 10 г/л. Все добавки вводили в среду перед ее стерилизацией.

Определение ростового коэффициента. Через каждые двое суток культивирования определяли высоту, плотность и диаметр колонии [20]. Плотность колонии оценивалась по трехбалльной системе: 1 – редкая, мицелий редкий, плохо различимый невооруженным глазом; 2 – средняя, субстрат различим; 3 – плотная, субстрат не виден. Ростовый коэффициент (PK) рассчитывали по формуле:

$$PK = (D \cdot h \cdot g) / t,$$

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

Определение выхода биомассы. Мицелий снимали с агаризованной среды с помощью скальпеля и пинцета. Для отделения остатков агаризованной среды от биомассы к снятому мицелию добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:10 и кипятили в течение 1–2 мин. Биомассу отфильтровывали через двойной тканевый шелковый фильтр на воронке Бюхнера с использованием водоструйного насоса и высушивали при комнатной температуре. Выход биомассы определяли гравиметрически [19].

Определение содержания меланина. Экстракцию меланина из биомассы осуществляли в течение 2 ч на кипящей водяной бане 2%-м раствором NaOH с коэффициентом разбавления 1:100 [21]. Полученный экстракт охлаждали и подкисляли 25%-м раствором HCl до pH = 2,0. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин и растворяли в 2%-м растворе NaOH. Измерение проводили на спектрофотометре UNICO 2800 UV/VIS при длине волны 490 нм. Содержание меланина определяли по калибровочной кривой, в качестве стандарта использовали меланин, выделенный из природной чаги, в диапазоне концентраций 0,02–0,2 мг/мл.

Содержание фенольных соединений определяли спектрофотометрическим методом Фолина – Чокальтеу. Оптическую плотность растворов определяли при длине волны 735 нм [22]. Для построения калибровочной кривой использовали галловую кислоту в диапазоне концентраций 25–200 мкг/мл.

Определение антиоксидантной активности. Определение суммарного содержания антиоксидантов в исследуемых образцах проводили амперометрическим методом на приборе Цвет Яуза 01-AAA (НПО «Химавтоматика», Россия) по методике, представленной в работе [23]. Калибровочную кривую строили по кверцетину в диапазоне концентраций 0,2–4,0 мг/л.

Элементный состав меланинов определяли на автоматическом CHNS-анализаторе PE 2400 Series II. Содержание кислорода рассчитывали по разнице C, H и N. Для анализа готовили образцы с влажностью не более 8 %.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и идентификация *Inonotus obliquus* SUB2092728. Проведено определение последовательности и филогенетическая оценка выделенной культуры (рис. 1–3). Получен качественный сиквенс длиной в 729 последовательностей олигонуклеотидов. Культура зарегистрирована в базе данных Genbank Overview с присвоением номера SUB2092728 и учетного номера MH918775.1.

```

>MH918775.1 Inonotus obliquus strain SUB2092728 internal transcribed spacer 1, partial
sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
GAGTTTATTTGAAATCGAGGGCCCTGTGCTGGCAGGAAACGTTTGCATGTGCACGGCCTTTCGTGCTC
AAATCCAACTCTCAAAKCCCTGTGCACCTATACAAAGTTGAAGCTTCTAGTAGTTTCTGTAAATCGAACGGC
AAGTCAAGTACGTGAGTAATCAAGTACGAGGTTTCGGCCCTTGGAAAGTGTGAAAGATGGAAAGGCACAA
GCTTCAGAGACAAGGAGACGAAAGGCTTTGGCTTCATTACAAACACCAATATAATTGTTATGTGAATG
AAATGCTCCTTGTGGCGATAAATAACAACCTTCAACACGGACTCTAGBCTCTCGCATCGATGAAG
AACCGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACT
TGCGCCCTTGTGATTCGAGGGGCAATCGCTGTTTGAAGTGTATGTAATCAAAATCGCTCTGTCTATTT
TTAATTGAAGTGGCTTTCGATTTGACCTTGGAGGTTTTCGCTGGCCCGGCGACTTGTGTCCTTGGTTGTTGTT
TGTGCGCTCCTCAAAATCAATTAAGTGTGACTTGTGCTGAGTTTACGGTGAATAATGTAATGTTCACT
AAGACGCTTGCCTCAAAAGTCTGCTTCAATTTGCTTAAAGTGGACAAAGATCCCTTCTGTTGGCCCTTC
TTGACACCTTTGACCTCAAATCAAGTGAAG
    
```

Рис. 1. Последовательность олигонуклеотидов *Inonotus obliquus* SUB2092728

Fig. 1. Oligonucleotide sequence of *Inonotus obliquus* SUB2092728

С помощью программного пакета BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) установлены наиболее близкие к SUB2092728 штаммы *Inonotus obliquus*: IOSF373816, NAAS02305, F1501, MDJCBS88, зарегистрированные в базе данных GenBank (рис. 2).

Description	Per. Ident	Accession
Inonotus obliquus strain SUB2092728 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100.00%	MH918775.1
Inonotus obliquus strain IOSF373816 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.56%	MH150920.1
Inonotus obliquus isolate HLJUS418 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.50%	KC312667.1
Inonotus obliquus strain NAAS02305 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.45%	KP006970.1
Inonotus obliquus isolate FS656163 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.45%	GU903008.1
Inonotus obliquus strain F1501 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.45%	KY948235.1
Inonotus obliquus isolate SH5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.44%	FJ196114.1
Inonotus obliquus strain MDJCBS88 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.31%	DQ103082.1
Inonotus obliquus isolate inon-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.17%	KX506009.1
Inonotus obliquus strain IFO 8681 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	88.90%	AY550593.1

Рис. 2. Сравнение идентичности генетической последовательности *Inonotus obliquus* SUB2092728 с базой данных NCBI

Fig. 2. *Inonotus obliquus* SUB2092728 genetic sequence comparison with the NCBI database

Полученные результаты анализа культурально-морфологических признаков, а также ДНК-секвенирования выделенной культуры подтверждают, что она действительно является штаммом базидиального гриба *Inonotus obliquus*.



Рис. 3. Филогенетическое древо *Inonotus obliquus* SUB2092728

Fig. 3. Phylogenetic tree analysis of 18 Basidiomycota ITS nucleotide sequences

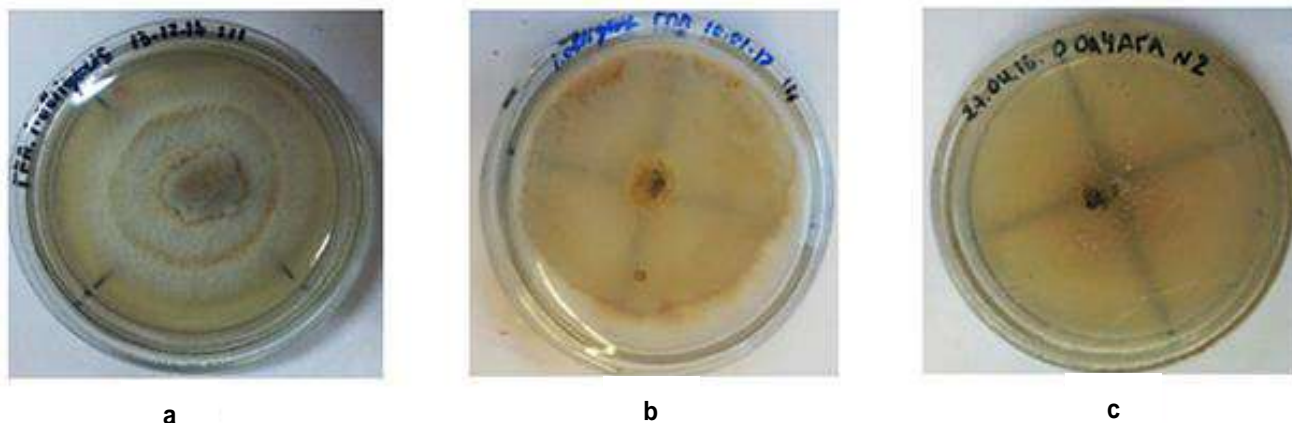


Рис. 4. Начало пигментирования колонии штамма гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728 на агаризованных средах: а – ГКА; б – ГПА; с – ООА

Fig. 4. Colony pigmentation beginning of *Inonotus obliquus* SUB2092728 strain on agar culture media: a – Glucose-potato; b – Glucose-peptone; c – Oat Decoction

Выбор среды культивирования для *Inonotus obliquus* SUB2092728. Место и условия произрастания гриба *Inonotus obliquus* оказывают существенное влияние на метаболизм выделяемого гриба. При этом для каждого штамма необходимо подбирать индивидуальные условия и стимулирующие компоненты для его лучшего роста и накопления целевых продуктов. Согласно литературным данным, для культуры *Inonotus obliquus* в качестве базовой питательной среды используют различные агаризованные среды: глюкозо-пептонную среду, картофельно-глюкозный агар, солодово-пептонный агар, а также среды с овсяным экстрактом или мукой, соломой и т.д. В качестве источников углерода обычно используют глюкозу, азота – пептон или природные экстракты (кукурузный, дрожжевой, овсяный и др.), а также неорганические соединения ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NaNO_3 , KNO_3) [8–19, 21]. В данной работе для выбора базовой среды для культивирования *Inonotus obliquus* SUB2092728 исследовались три агаризованные питательные среды: ГКА, ГПА, ООА. Показано, что на 2-е сутки выращивания штамма на всех питательных средах наблюдается рост мицелия, при этом колонии были белого цвета. Гриб *Inonotus obliquus* образовывал на средах ГКА и ГПА плотные пушистые войлочные колонии, а на ООА они были рыхлыми и ватообразными. Их окрашивание в светло-желтый цвет начиналось на среде ГКА на 8-й день, на среде ГПА – на 11-й день, а на среде ООА – лишь на 20-й день культивирования. В ходе дальнейшего роста колонии приобретали коричневую окраску (рис. 4).

Характер роста культуры на средах ГКА, ГПА и ООА представлен на рис. 5.

Как видно из графиков, представленных на

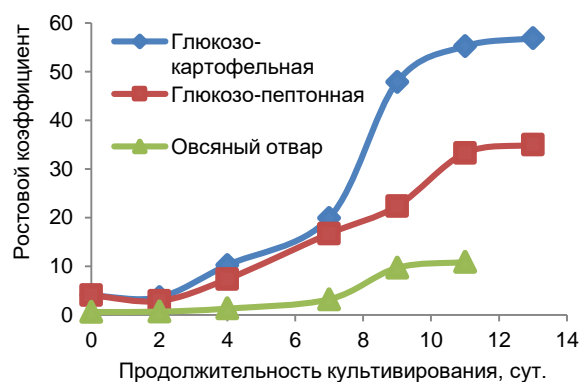


Рис. 5. Ростовой коэффициент *Inonotus obliquus* SUB2092728 на агаризованных средах

Fig. 5. Growth coefficients of *Inonotus obliquus* SUB2092728 on agar culture media

рис. 5, использование среды ГКА позволяет сократить лаг-фазу на 2-е сутки по сравнению с использованием других сред. Ростовой показатель культуры *Inonotus obliquus* SUB2092728 на среде ГКА в 3 раза выше по сравнению с показателями на ГПА и в 15 раз больше по сравнению с ООА.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что применение среды ГКА позволяет увеличить скорость роста *Inonotus obliquus* SUB2092728 в 1,5–3 раза по сравнению с использованием других сред. Культура, выращенная на среде ГКА, имеет высокий выход биомассы и меланина, что соответственно в 1,5 и 2 раза больше по сравнению с использованием среды ГПА. Штамм *Inonotus obliquus* SUB2092728, выращенный на среде ООА, имел редкий мицелий, поэтому полученного количества продукта было недостаточно для определения выхода биомассы и накопленного ею меланина.

Таблица 1
Выход биомассы и накопление меланина у гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728, выращенного на агаризованных питательных средах, на 30-е сутки культивирования

Table 1
Biomass yield and melanin accumulation by *Inonotus obliquus* SUB2092728 fungus, grown on agarized culture media at the 30th day of cultivation

Среда	Скорость роста, мм/сут.	Выход биомассы, мг/см ²	Содержание меланина,	
			мг/см ²	%*
ГКА	2,13	2,38±0,22	0,15±0,003	6,67±0,09
ГПА	1,50	1,59±0,09	0,06±0,002	4,59±0,12
ОАА	0,64	–	–	–

Примечание. * – от абсолютно сухой биомассы.

Для объяснения лучшего роста штамма *Inonotus obliquus* SUB2092728 на среде ГКА проанализирован углеводный состав использованных в работе сред (табл. 2).

По содержанию моносахаридов наилучшие показатели, способные удовлетворить рост гриба, имеют среды ГПА и ГКА, дополнительным источником питания в последней среде может служить сахароза.

Таблица 2
Содержание углеводов в питательных средах²

Table 2
Carbohydrate content in culture media²

Источник углерода	Содержание, г/л		
	Среда		
	ГКА	ГПА	ОАА
Моносахариды:			
глюкоза	2,14	3	0,02
фруктоза	0,02	–	–
арабиноза	–	–	0,01
галактоза	–	–	0,01
ксилоза	–	–	0,02
Олигосахариды:			
сахароза	0,12	–	0,27
раффиноза	–	–	0,02
Полисахариды:			
крахмал	3,0	–	11,0

Наряду с простыми углеводами большинство штаммов *Inonotus obliquus* могут использовать в качестве источника углерода крахмал [5, 16, 19]. Кроме того, в крахмале в следовых количествах могут содержаться стимулирующие

рост гриба вещества. Однако увеличение содержания крахмала в среде с уменьшением количества глюкозы, как, например, в среде ОАА, не приводит к улучшению показателей роста и выхода биомассы. По-видимому, предпочтительным источником энергии для *Inonotus obliquus* SUB2092728 является глюкоза, которая содержится в достаточном количестве в среде ГКА. Так, один из новых штаммов *Inonotus obliquus*, полученный китайскими учеными [10], по генетическим характеристикам наиболее близкий к штамму F1501, а, следовательно, и к SUB2092728, показывает значительное увеличение биомассы при добавлении в питательную среду раствора глюкозы на 5–8-е сутки культивирования.

Исследование влияния источников лигнина в питательной среде на рост гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728 и накопление им меланина. Для увеличения выхода биомассы и БАВ при культивировании *Inonotus obliquus* исследовалось добавление к базовой питательной среде самых разных компонентов: аминокислот, витаминов [8], органических растворителей (метанол, этанол, ацетон, хлороформ, толуол), жирных кислот (линолевая, олеиновая, пальмитиновая, стеариновая), поверхностно-активных веществ (Твин 20, Твин 80, CHAPS, Тритонкс-100, ПЭГ 4000) [11], гидролизованной лигнинцеллюлозы [12], экстрактов бересты и древесины березы [13]. В работе [14] показано, что для биоконверсии *Inonotus obliquus* может использоваться лигнин-целлюлозное сырье (пшеничные отруби, пшеничную и рисовую солому, скорлупу арахиса, жмых сахарного тростника, кожуру маниоки, ветви березы и бука).

Выращивание культуры рода *inonotus* может довольно успешно осуществляться и непосредственно на березовых блоках [24]. При добавлении в питательную среду гидролизованной лигнинцеллюлозы при культивировании штамма *Inonotus obliquus* CBS314.39 наблюдается существенное увеличение содержания белка, углеводов, а также повышение антиоксидантной активности экзополисахаридной фракции [12].

В данной работе с целью увеличения выхода биомассы и меланина при культивировании *Inonotus obliquus* SUB2092728 к питательной среде добавляли опилки березы, отвар коры дуба и полифепан. Опилки березы выбраны как лигнинсодержащий субстрат, используемый грибом в природных условиях [6, 7].

Полифепан представляет собой гидролизованный лигнин древесины и может облегчить его усвоение грибом.

² Скурихин И.М. Химический состав российских пищевых продуктов: справочник. М.: ДеЛи принт, 2002. 236 с.

Отвар коры дуба содержит дубильные, фенольные и другие биологически активные вещества, которые гриб может использовать в своем метаболизме, и, возможно, они могут оказать стимулирующее воздействие на рост биомассы и синтез меланина.

Рассчитано содержание фенольных соединений и лигнина в мг на 1 см² поверхности среды на основе ГКА (табл. 3).

Таблица 3
Содержание лигнина и фенольных соединений в питательной среде на основе ГКА

Table 3
Lignin and phenolic compounds content of Glucose-potato based nutrient media

Источник лигнина и фенольных соединений	Содержание лигнина, мг/см ²	Содержание фенольных соединений, мг/мл
Опилки березы 10 %	0,62*	0,143±0,02
Отвар коры дуба 1 мл	–	1,419±0,18
Полифепан 0,01 %	0,31**	0,0004±0,00001
Полифепан 0,10 %	3,13**	0,0049±0,0001

Примечание. * – литературные данные [25];
 ** – содержание в лекарственной форме «Полифепан».

Как видно из представленных в табл. 3 данных, содержание лигнина в средах отличается на порядок. При этом наблюдаются более высокие концентрации фенольных соединений в среде с отваром коры дуба и низкие – в среде с гидролизованым лигнином.

Проведено исследование влияния лигнин-содержащих добавок в среду на рост гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728 при твердофазном

культивировании на среде ГКА (рис. 6).

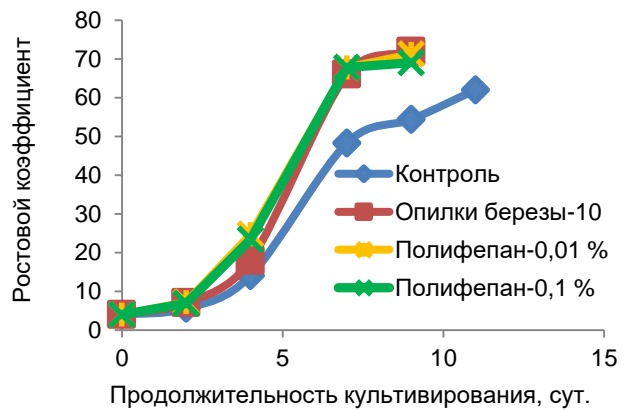


Рис. 6. Ростовой коэффициент *Inonotus obliquus* SUB2092728 в процессе культивирования на средах с различными источниками лигнина

Fig. 6. Growth coefficients changes of *Inonotus obliquus* SUB2092728 during cultivation on media with different lignin sources

При использовании всех добавок к ГКА на 8-е сутки наблюдается пигментация мицелия. При добавлении к среде опилок березы и полифепана в разных концентрациях наблюдается лучший рост штамма *Inonotus obliquus* SUB2092728 по сравнению с его культивированием на других средах (табл. 4, см. рис. 6). В отличие от контроля у колоний, выращенных на средах с полифепаном и опилками, переход в стационарную фазу наблюдается уже на 7-е сутки. Установлено, что рост гриба *Inonotus obliquus* SUB2092728 стимулирует наличие в среде от 0,31 до 3,13 мг/см² лигнина.

Результаты выращивания штамма гриба на среде ГКА с добавлением отвара коры дуба оказались неэффективным, возможно, из-за высокого содержания в нем фенольных веществ и практически отсутствия лигнина (см. табл. 3). Это также подтверждается данными по накоплению грибом биомассы и меланина (табл. 4).

Таблица 4
Выход биомассы и накопление меланина на тридцатые сутки культивирования *Inonotus obliquus* SUB2092728 на питательных средах с внесением различных источников лигнина

Table 4
Biomass yield and melanin accumulation on the 30th day of *Inonotus obliquus* SUB2092728 cultivation on nutrient media with a various lignin sources addition

Среда	Средняя скорость роста, мм/сут	Выход биомассы, г/см ²	Содержание меланина,	
			мг/см ²	%*
Контроль	2,13	2,38±0,22	0,15±0,0032	6,67±0,09
Опилки березы 10%	3,17	5,87±0,32	0,58±0,0040	14,53±0,16
Полифепан 1,0%	3,50	5,71±0,15	0,55±0,0033	15,78±0,34
Полифепан 0,1%	3,60	5,08±0,24	0,53±0,0035	13,70±0,28

Примечание. * – от абсолютно сухой биомассы.

Согласно полученным данным, использование гидролизованного лигнина (полифепана) в составе среды культивирования позволяет увеличить скорость роста *Inonotus obliquus* SUB2092728 в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Независимо от источника лигнина, внесенного в питательную среду, выход биомассы, а также содержание в ней меланина выше в 2 раза по сравнению с контролем.

Из литературных данных известно, что штамм *Inonotus obliquus* В-26 на среде ГПА образует меланин в количестве 13,8 % от абсолютно сухой биомассы [19], в то время как *Inonotus obliquus* SUB2092728 накапливает меланин до 15,8 % на среде ГКА с добавлением полифепана в концентрации 1,0 %.

Для оценки качества полученного меланина проведено сравнение физико-химических харак-

теристик меланинов, выделенных из биомассы штамма *Inonotus obliquus* SUB2092728, с природным меланином чаги.

Анализ элементного состава исследуемых образцов (табл. 5) показал, что в меланинах, выделенных из культивируемой чаги, содержание углерода в 1,5 раза ниже, чем в меланинах, выделенных из природной чаги. Количество азота в меланинах, выделенных из культивируемой чаги, выше по сравнению с меланином из природной чаги в 2 раза. Кроме того, они имеют в 3 раза более высокое отношение О/С по сравнению с меланином природной чаги. Это свидетельствует о меньшей степени их ароматичности – в 2 раза ниже. Значения мольных соотношений С/Н и Н/С указывают на более высокую степень алифатичности меланинов из культивируемых штаммов в сравнении с выделенными из природной чаги.

Таблица 5
 Элементный состав и антиоксидантная активность меланинов чаги

Table 5

Chaga melanins antioxidant activity and elemental composition

Меланин	С,%	Н,%	Н,%	О,%	О/С	Н/С	С/Н	Антиоксидантная активность меланина, мг/г *
Из природной чаги	53,6±1,0	4,2±0,2	0,29±0,05	41,8±0,2	0,59	0,07	12,76	88,79±0,79
В-26 **	38,2±0,1	5,5±0,2	5,8±0,1	50,4±0,2	1,32	0,15	6,89	–
Контроль	38,6±0,3	6,3±0,2	1,4±0,1	53,5±0,4	1,38	0,16	6,08	42,37±0,60
Опилки березы 10%	36,7±0,5	6,3±0,0	2,2±0,1	54,6±0,7	1,48	0,17	5,80	64,93±0,097
Полифепан 0,1%	33,9±0,1	6,1±0,2	1,9±0,1	57,7±0,0	1,70	0,17	5,48	88,64±2,88
Полифепан 1,0%	34,3±0,8	6,1±0,3	1,2±0,1	58,3±1,2	1,70	0,17	5,43	102,96±0,70

Примечание. * – в пересчете на кверцетин; ** – литературные данные [26].

Несмотря на существенные отличия элементного состава меланинов, полученных при добавлении в среды полифепана и выделенных из природной чаги, они имеют близкие значения антиоксидантной активности, в 2 раза превышающие контроль (см. табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выделен, идентифицирован и введен в культуру еще один высокопродуктивный по биомассе и меланину штамм гриба *Inonotus obliquus*. Показано, что *Inonotus obliquus* SUB2092728 имеет максимальную скорость роста – 2,18 мм/сут., на среде ГКА с началом пигментации на 8-е сутки

роста. Подбор источника лигнина позволил интенсифицировать рост гриба и увеличить скорость его роста до 3,60 мм/сут. Установлено, что меланины, выделенные из культивируемого штамма на 30-й день культивирования, близки между собой и отличаются от меланина природной чаги. Для них показана в 2 раза более низкая степень ароматичности и в 2 раза более высокая степень алифатичности по сравнению с меланином природной чаги. Установлено, что меланин, полученный при добавлении в среду полифепана в концентрации 1,0 г/л, имеет более высокую антиоксидантную активность – на 16 % большую, чем у природного меланина, и в 2 раза превышающую контроль.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zheng W., Miao K., Liu Y., Zhao Y., Zhang M., Pan S., et al. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus ob-*

liquus and submerged culture strategies for upregulating their production // Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 87. Issue 4.

- P. 1237–1254. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2682-2>
2. Szychowska K.A., Rybczyńska-Ткаczyk K., Tobiasza J., Yelnytska-Stawasza V., Pomianek T., Gmińska J. Biological and anticancer properties of *Inonotus obliquus* extracts // *Process Biochemistry*. 2018. Vol. 73. P. 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.015>
 3. Seo H-K., Lee S-C. Antioxidant activity of subcritical water extracts from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) // *Separation Science and Technology*. 2010. Vol. 45. Issue 2. P. 198–203. <https://doi.org/10.1080/01496390903423899>
 4. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G., Wagner H., Verpoorte R., Heinrich M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications // *Journal of Ethnopharmacology*. 2014. Vol. 154. Issue 3. P. 481–536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007>
 5. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Ксилотрофные базидомицеты в чистой культуре: монография. Пенза: РИО ПГСХА, 2013. 222 с.
 6. Сысоева М.А. Высокодисперсные коллоидные системы и меланин чаги: монография. Казань: Изд-во КНИТУ, 2013. 226 с.
 7. Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Лекарственные грибы из экосистем Южного Байкала. Иркутск: ООО Изд-во «Время странствий», 2012. 104 с.
 8. Cho N.-S., Shin Y.-S. Optimization of *in vitro* cultivation of *Inonotus obliquus* // *Journal of the Korean Wood Science and Technology*. 2005. Vol. 33. Issue 5. P. 92–98.
 9. Jalc D., Siroka P., Ceresnáková Zb. Effect of six species of white-rot basidiomycetes on the chemical composition and rumen degradability of wheat straw // *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1997. Vol. 43. Issue 3. P. 133–137.
 10. Wei Z.-H., Chen N., Li Y.-J., Fan Q.-L., Yu T.-F., Wang K.-X., et al. Glucose fed-batch integrated dissolved oxygen control strategy enhanced polysaccharide, total triterpenoids and inotodiol production in fermentation of a newly isolated *Inonotus obliquus* strain // *Process Biochemistry*. 2018. Vol. 66. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.006>
 11. Xu X., Quan L., Shen M. Effect of chemicals on production, composition and antioxidant activity of polysaccharides of *Inonotus obliquus* // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. Vol. 19. Issue 77. P. 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.013>
 12. Xiang Y., Xu X., Li J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium // *Food Chemistry*. 2012. Vol. 134. Issue 4. P. 1899–1905. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.121>
 13. Wang L.-X., Lu Z.-M., Geng Y., Zhang X.-M., Xu G.-H., Shi J.-S., et al. Stimulated production of steroids in *Inonotus obliquus* by host factors from birch // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014. Vol. 118. Issue 6. P. 728–731. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.05.022>
 14. Xu X., Lin M., Zang Q., Shi S. Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification // *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 247. P. 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.192>
 15. Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Теплякова Т.В., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Сухих А.С. Антиретровирусная активность меланинов из природной и культивируемой чаги (*Inonotus obliquus*) // *Успехи медицинской микологии*. 2014. Т. 12. С. 299–301.
 16. Пат. № 10670, Республика Беларусь. МПК С 12N 1/14, С 12P 19/00. Штамм гриба *Inonotus obliquus* БИМ F-350 Д – продуцент меланина, обладающий антимуtagenными свойствами / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Н.В. Иконникова, Т.А. Пучкова, Т.В. Филимонова; патентообладатель Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»; N а 20060292; заявл. 03.04.2006; опубл. 30.06.2008.
 17. Ананько Г.Г., Теплякова Т.В., Бардашева А.В., Ильичева Т.Н. Меланины из глубинной культуры *Inonotus obliquus* и их противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса 2 типа // *Успехи медицинской микологии*. 2015. Т. 14. С. 384–388.
 18. Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Технологические культуры лекарственных грибов и их биологическая активность // *Успехи медицинской микологии*. 2015. Т. 14. С. 446–454.
 19. Иконникова Н.В., Щерба В.В. Накопление меланиновых пигментов у штаммов *Phellinus robustus* и *Inonotus obliquus* при поверхностном культивировании // *Известия Национальной академии наук Беларуси*. 2009. N 2. С. 43–47.
 20. Бухало А.С., Дудка И.А. Высшие съедобные базидомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
 21. Poyedinok N., Mykhaylova O., Tugay T., Tugay A., Negriyko A., Dudka I. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity and melanin accumulation of liquid-cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat. // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015. Vol. 176. Issue 2. P. 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1577-3>
 22. Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19. N 4. С. 373–380. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.4.012>
 23. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на

здоровье и старение человека. М.: ТрансЛит, 2009. 212 с.

24. Горноста́й Т.Г., Оленников Д.Н., Пензина Т.А. Полякова М.С., Боровский Г.Б. Перспектива использования мицелия грибов рода *Inonotus* в качестве источника биоантиоксидантов // Биоантиоксидант: тезисы докладов IX Международной конференции (Москва, 29 сентября – 02 октября 2015 г.). М.: Изд-во РУДН, 2015. С. 42.

25. Babitskaya V.G., Scherba V.V., Ikonnikova N.V., Bisko N.A., Mitropolskaya N.Yu. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (Chaga) (*Aphyllorhizomycetidae*) // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2002. Vol. 4. Issue 2. P. 139–145. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i2.70>

26. Сушинская Н.В., Курченко В.П. Меланины трутовых грибов // Труды Белорусского государственного университета. Серия: физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2006. Т. 1. N 1. С. 144–155.

REFERENCES

1. Zheng W, Miao K, Liu Y, Zhao Y, Zhang M, Pan S, et al. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for upregulating their production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(4):1237–1254. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2682-4>

2. Szychowska KA, Rybczyńska-Tkaczyk K, Tobiasza J, Yelnytska-Stawasza V, Pomianek T, Gmińska J. Biological and anticancer properties of *Inonotus obliquus* extracts. *Process Biochemistry*. 2018;73:180–187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.015>

3. Seo H-K, Lee S-C. Antioxidant activity of subcritical water extracts from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Separation Science and Technology*. 2010;45(2):198–203. <https://doi.org/10.1080/01496390903423899>

4. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Wagner H, Verpoorte R, Heinrich M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;154(3):481–536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007>

5. Ilyina GV, Ilyin DYu. *Xylotrophic basidiomycetes in a pure culture*. Penza: Penza State Agriculatural Academy; 2013. 222 p. (In Russian)

6. Sysoeva MA. *Highly dispersive colloidal systems and chaga melanin*. Kazan: Kazan National Research Technical University; 2013. 226 p. (In Russian)

7. Ogarkov BN, Ogarkova GR, Samusenok LV. *Medicinal mushrooms from Southern Baikal ecosystems*. Irkutsk: Vremya stranstvii; 2012. 104 p. (In Russian)

8. Cho N-S, Shin Y-S. Optimization of *in vitro* cultivation of *Inonotus obliquus*. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*. 2005;33(5):92–98.

9. Jalc D, Siroka P, Ceresnáková Zb. Effect of six species of white-rot basidiomycetes on the chemical composition and rumen degradability of wheat straw. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1997;43(3):133–137.

10. Wei Z-H, Chen N, Li Y-J, Fan Q-L, Yu T-F, Wang K-X, et al. Glucose fed-batch integrated dissolved oxygen control strategy enhanced polysaccharide, total triterpenoids and inotodiol production in fermentation of a newly isolated *Inonotus obliquus*

strain. *Process Biochemistry*. 2018;66:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.006>

11. Xu X, Quan L, Shen M. Effect of chemicals on production, composition and antioxidant activity of polysaccharides of *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;19(77):143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.013>

12. Xiang Y, Xu X, Li J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. *Food Chemistry*. 2012;134(4):1899–1905. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.121>

13. Wang L-X, Lu Z-M, Geng Y, Zhang X-M, Xu G-H, Shi J-S, et al. Stimulated production of steroids in *Inonotus obliquus* by host factors from birch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014;118(6):728–731. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.05.022>

14. Xu X, Lin M, Zang Q, Shi S. Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*. 2018;247:88–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.192>

15. Gashnikova NM, Balakhnin SM, Teplyakova TV, Ananko GG, Kosogova TA, Sukhikh AS. Antiretroviral activity of melanins from natural and cultivated chaga (*Inonotus obliquus*). *Uspekhi meditsinskoi mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2014;12:299–301. (In Russian)

16. Babitskaya VG, Shcherba VV, Ikonnikova NV, Puchkova TA, Filimonova TV. BIM F-350 D strain of fungus *Inonotus obliquus* – a producer of melanin with antimutagenic properties. Patent of the Belarus Republic, no. 10670, 2008. (In Russian)

17. Ananko GG, Teplyakova TV, Bardasheva AV, Ilicheva TN. Melanins of *inonotus obliquus* from submerged culture and their antiviral activity against type 2 herpes simplex virus. *Uspekhi meditsinskoi mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2015;14:384–388. (In Russian)

18. Ogarkov BN, Ogarkova GR, Samusenok LV. Technological cultures of medicinal mushrooms and their biological activity. *Uspekhi meditsinskoy mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2015;14:446–454. (In Russian)

19. Ikonnikova NV, Shcherba VV. Accumulation of melanin pigments in strains of *Phellinus robustus* and *Inonotus obliquus* during surface cultivation. *Izvestiya natsionalnoi akademii nauk Belarusi* = Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. 2009;2:43–47. (In Russian)

20. Bukhalo AS, Dudka IA. *Higher edible basidiomycetes in a pure culture*. Kiev: Naukova Dumka, 1988; 144 p. (in Russian)

21. Poyedinok N, Mykhaylova O, Tugay T, Tugay A, Negriyko A, Dudka I. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity and melanin accumulation of liquid-cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015;176(2): 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1577-3>

22. Denisenko TA, Vishnikin AB, Tsiganok LP. Spectrophotometric determination of sum of phenolic compounds in plants using aluminum chloride, 18-molybdodiphosphate and Folin-Ciocalteu reagents. *Analitika i kontrol* = Analytics and Control. 2015;19(4):373–380. (In Russian) <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.4.012>

23. Yashin Yal, Ryzhnev VYu, Yashin AYa, Chernousova NI. *Natural antioxidants. Content in foods and their impact on human health and aging*. Moscow: TransLit; 2009. 212 p. (In Russian)

24. Gornostay TG, Olenikov DN, Penzina TA, Polyakova MS, Borovskiy GB. The prospect of using of *inonotus* genus as a source of bioantioxidants. In: *Bioantioxidant: Proceedings of the IX International Conference*. 29 September – 02 October, Moscow. Moscow: RUDN University; 2015, p. 42. (In Russian)

25. Babitskaya VG, Scherba VV, Ikonnikova NV, Bisko NA, Mitropolskaya NYu. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (Chaga) (*Aphylllophoromycetideae*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2002;4(2):139–145. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i2.70>

26. Sushinskaya NV, Kurchenko VP. Melanins of tinder fungi. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta* = Scientific works of the Belarusian State University 2006;1(1):144–155. (In Russian)

Критерии авторства

Сысоева М.А., Уразлина Л.Н., Хабибрахманова В.Р., Григорьева Т.В., Сысоева Е.В. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Сысоева М.А., Уразлина Л.Н., Хабибрахманова В.Р., Григорьева Т.В., Сысоева Е.В. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сысоева Мария Александровна, д.х.н., доцент, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68, Российская Федерация, ✉ e-mail: oxygen1130@mail.ru

Уразлина Ляйсян Наилевна, аспирант, Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68, Российская Федерация, e-mail: industrious.64@mail.ru

Contribution

Maria A. Sysoeva, Lyaysyan N. Urazlina, Venera R. Khabibrakhmanova, Tatyana V. Grigoryeva, Elena V. Sysoeva have carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. Maria A. Sysoeva, Lyaysyan N. Urazlina, Venera R. Khabibrakhmanova, Tatyana V. Grigoryeva, Elena V. Sysoeva have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Maria A. Sysoeva, Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Food Biotechnology Department, Kazan National Research Technological University, 68 Karl Marx St., Kazan 420015, Russian Federation, ✉ e-mail: oxygen1130@mail.ru

Lyaysyan N. Urazlina, Postgraduate Student, Kazan National Research Technological University, 68 Karl Marx St., Kazan 420015, Russian Federation, e-mail: industrious.64@mail.ru

Хабибрахманова Венера Равилевна,
к.х.н., доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: venerakhabirakhmanova@gmail.com

Григорьева Татьяна Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: 1Tatyana.Grigoreva@kpfu.ru

Сысоева Елена Владиславовна,
к.х.н., доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: inonotus@yandex.ru

Venera R. Khabibrakhmanova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Kazan National Research Technological
University,
68 Karl Marx St., Kazan 420015,
Russian Federation,
e-mail: venerakhabirakhmanova@gmail.com

Tatyana V. Grigoryeva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Kazan National Research Technological
University,
18 Kremlevskaya St., Kazan 420008,
Russian Federation,
e-mail: tatabio@inbox.ru

Elena V. Sysoeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Kazan National Research Technological
University,
68 Karl Marx St., Kazan 420015,
Russian Federation,
e-mail: inonotus@yandex.ru