

## Аспекты пищевой безопасности водного и сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстрактов гриба *Inonotus obliquus*



Н. Г. Ли\*, Т. К. Каленик

Дальневосточный федеральный университет<sup>ROR</sup>, Владивосток, Россия

Дата поступления в редакцию: 11.01.2021

Дата принятия в печать: 05.02.2021



\*e-mail: [li.ng@dvfu.ru](mailto:li.ng@dvfu.ru)

© Н. Г. Ли, Т. К. Каленик, 2021

### Аннотация.

**Введение.** Использование в качестве компонентов пищевых систем экстрактов и извлечений, контаминированных микроорганизмами, несет угрозу последующей микробной загрязненности пищевого продукта и ухудшению его показателей качества и безопасности, что неизбежно приводит к экономическим потерям и риску для здоровья потребителя. В этой связи необходимым представляется исследование микробиологической чистоты полученных экстрактов, в том числе экстрактов гриба *Inonotus obliquus*, предлагаемых для внесения в пищевые продукты. Вторым немаловажным аспектом исследования безопасности экстрактов и биологически активных соединений является изучение токсичности на живом тест-объекте.

**Объекты и методы исследования.** Водный и сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракты гриба *Inonotus obliquus*. Водный экстракт гриба *Inonotus obliquus* получали по методу, указанному в Государственной Фармакопее СССР. Сверхкритическую CO<sub>2</sub>-экстракцию проводили при использовании сверхкритической системы флюидной экстракции Thar SFE-500F-2-FMC50. Микробиологические показатели определяли стандартными действующими методами. Определение относительной биологической ценности (ОБЦ) и выявление возможных токсичных свойств проводили методом биотестирования на инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что в течение всего испытываемого срока хранения показатели, характеризующие микробную обсемененность экстрактов, оставались на низком уровне. Также отмечена микробная деактивация диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии контаминантов экстракта. В ходе эксперимента на культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis* установлено отсутствие угнетения подвижности и роста, форма клеток инфузорий овальная, ровная, деформация клеточных стенок не обнаружена. Это свидетельствует об отсутствии токсичного действия исследуемых экстрактов.

**Выводы.** Для испытываемых экстрактов гриба *Inonotus obliquus* характерна стабильность и прослеживаемость микробиологических показателей в процессе хранения, отмечены высокие показатели ОБЦ и установлена токсикологическая безопасность на тест-объекте инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Это позволяет использовать водный и сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракты в качестве компонентов пищевых систем.

**Ключевые слова.** Чага, грибы, растительные экстракты, токсичность, микробная инактивация, обсемененность, *Tetrahymena pyriformis*, относительная биологическая ценность

**Финансирование.** Работа выполнена на базе Департамента пищевых наук и технологий Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета (ДВФУ)<sup>ROR</sup>.

**Для цитирования:** Ли, Н. Г. Аспекты пищевой безопасности водного и сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстрактов гриба *Inonotus obliquus* / Н. Г. Ли, Т. К. Каленик // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 1. – С. 125–133. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-125-133>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

## Safety Assessment of Aqueous and Supercritical CO<sub>2</sub> Extracts of the Chaga Mushroom *Inonotus obliquus*

Natalia G. Li\*, Tatyana K. Kalenik

Far Eastern Federal University<sup>ROR</sup>, Vladivostok, Russia

Received: January 11, 2021

Accepted: February 05, 2021

\*e-mail: [li.ng@dvfu.ru](mailto:li.ng@dvfu.ru)



## Abstract.

**Introduction.** Plant materials are susceptible to microbial contamination at all stages of the technological process and storage. This problem becomes highly relevant when extracting biologically active compounds from the *Inonotus obliquus* chaga mushroom. If used in food systems, contaminated extracts may cause their subsequent microbial contamination, as well as deterioration of quality and safety, which inevitably leads to economic losses and health risks. *Inonotus obliquus* is a popular component of various functional foods; therefore, the microbiological purity of its extracts requires a thorough analysis. In this regard, toxicity in a living test object is another important aspect of the safety studies of extracts and biologically active compounds. Before introducing a new food additive or component into the food system, it has to be tested for toxic properties.

**Study objects and methods.** The research featured aqueous and supercritical CO<sub>2</sub>-extracts of the *Inonotus obliquus* chaga mushroom. The aqueous extract was obtained according to the method specified in the State Pharmacopoeia of the USSR. The supercritical CO<sub>2</sub> extraction was obtained using a Thar SFE-500F-2-FMC50 supercritical fluid extraction system. Microbiological indicators were determined by standard operating methods. The relative biological value and possible toxic properties were measured by biotesting on *Tetrahymena pyriformis*.

**Results and its discussion.** During the entire tested storage period, the microbial contamination of the extracts remained at a low level, while the contaminants in the supercritical extract showed signs of microbial deactivation by carbon dioxide. The experiment on the ciliates demonstrated no inhibition of motility and growth, the shape of the cells was oval, even, and the cell walls remained unaffected, which means that the extracts produced no toxic effect.

**Conclusion.** The extracts of the *Inonotus obliquus* mushroom proved to be biologically valuable and toxicologically safe. The test on *Tetrahymena pyriformis* showed stable and traceable microbiological indicators. Therefore, aqueous and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Inonotus obliquus* can be used in food industry.

**Keywords.** Chaga, mushroom, herbal extracts, toxicity, microbial inactivation, contamination, *Tetrahymena pyriformis*, relative biological value

**Funding.** The research was carried out on the premises of the Department of Food Science and Technology of School of Biomedicine of Far Eastern Federal University (FEFU) .

**For citation:** Li NG, Kalenik TK. Safety Assessment of Aqueous and Supercritical CO<sub>2</sub> Extracts of the Chaga Mushroom *Inonotus obliquus*. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(1):125–133. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-125-133>.

## Введение

Одним из видов растительного сырья, содержащего широкий комплекс биологически активных соединений, является бесплодная форма фитопатогенного гриба Трутовика скошенного – *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil. formasterilis (Van.) Nikol., сем. Гименохетовых (*Hymenochaetaceae*), тип Базидиальные грибы (*Basidiomycetes*). Гриб развивается в виде бесформенных наростов на березах и известен под названием «чага» или «березовый гриб» [1]. Извлечения гриба обладают антираковыми, противоопухолевыми, противовирусными и антиоксидантными свойствами [2, 3].

В технологии получения препаратов на основе гриба *Inonotus obliquus* основным процессом является экстрагирование сырья с помощью воды или другого органического растворителя, разрешенного для использования в фармацевтической и пищевой промышленности. Полифенолоксикарбонный комплекс, образующий в водных извлечениях коллоидную гидрофильную полидисперсную систему, составляет основную часть веществ, экстрагируемых водой из чаги. Большинство способов экстракции заключается в получении

водных извлечений. Дисперсионная среда этой системы содержит соли органических и минеральных кислот, полисахариды, полифенолы и другие, еще не выявленные, компоненты [4].

Несмотря на многочисленные существующие способы экстракции гриба *Inonotus obliquus*, основанные на использовании разных растворителей, сведения об использовании сверхкритического диоксида углерода в технологии получения экстрактов березового гриба отсутствуют. Экстракционная способность диоксида углерода в до- и сверхкритическом состоянии представлена в работах отечественных и зарубежных авторов [5–10]. Показано, что сверхкритическая экстракция, по сравнению с докритической, обладает высокой экстрагирующей способностью и извлекает широкий спектр соединений, включая органические кислоты, фенольные соединения, гликозиды, флавоновые агликоны, токоферолы и терпеноиды.

Структурно-групповой состав экстрактов гриба *Inonotus obliquus* составляют углеводороды, полифенолы, стерины, стеролы, тритерпены ланостанового типа, тритерпеновые спирты и эфиры. Особенностью сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта

*Inonotus obliquus* является содержанием большого числа полифенольных соединений, которые обладают антиоксидантным действием [2, 5].

Однако в вопросах экстракции биологически активных соединений из гриба *Inonotus obliquus* следует обратить внимание на проблему подверженности сырья микробной контаминации на всех этапах технологического процесса (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. К факторам, повышающим микробное обсеменение и приводящим к порче сырья, относят: влажность, температуру, запыленность, присутствие насекомых и др. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание, плесневение. При этом происходит разрушение ценных биологически активных соединений, а использование такого сырья становится бесполезным и небезопасным.

Особую опасность представляют собой плесневые грибы, которые на протяжении многих лет являются частыми контаминантами растительного лекарственного сырья. Среди плесневых грибов-контаминантов более 60 % относятся к родам *Aspergillus* и *Penicillium*, многие из которых известны как потенциальные продуценты микотоксинов [11].

В пищевой и фармацевтической промышленности первостепенным является входной контроль исходного сырья и материалов, регулирование условий хранения и переработки. Использование в качестве компонентов пищевых систем экстрактов и извлечений, контаминированных микроорганизмами, несет угрозу последующей микробной загрязненности пищевого продукта и ухудшению его показателей качества и безопасности. Это неизбежно приводит к экономическим потерям и риску для здоровья потребителя. В этой связи необходимым представляется исследование микробиологической чистоты полученных экстрактов, в том числе экстрактов гриба *Inonotus obliquus*, предлагаемых для внесения в пищевые продукты.

Вторым немаловажным аспектом исследования безопасности экстрактов и биологически активных соединений является изучение токсичности на живом тест-объекте. Перед использованием любой разработанной пищевой добавки или компонента, вводимого в состав пищевой системы, необходимо провести исследование на предмет отсутствия токсических свойств. Токсичность испытуемой добавки или пищевого продукта предлагается определять методом биотестирования по количеству инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, выживших или погибших в среде [12]. Выбор данного тест-организма обусловлен быстротой проведения анализа, его относительной простотой и дешевизной, высокой чувствительностью к алиментарным и токсическим факторам и наглядностью проявления

биологически активного эффекта. Физиологические изменения, поведенческая активность и реакции клеточных органелл этого организма являются показательными индикаторами присутствия различных токсикантов [13, 14]. При определении токсичности разработанных продуктов основными показателями являются поведение и характер роста клеток. Угнетение подвижности, замедление роста, незначительные деформации инфузорий, а также их гибель свидетельствуют о токсичности исследуемого продукта или добавки.

Целью работы является оценка пищевой безопасности водного и сверхкритического экстрактов гриба *Inonotus obliquus*.

#### **Объекты и методы исследования**

Водный экстракт гриба *Inonotus obliquus* получали по методу, указанному в Государственной Фармакопее СССР [15].

Сверхкритическую CO<sub>2</sub>-экстракцию проводили при использовании сверхкритической системы флюидной экстракции Thar SFE-500F-2-FMC50 (Parf Instrument, США). Углекислый газ сжат до желаемого давления при помощи компрессора аппарата сверхкритической экстракции. Емкость экстрагирования нагрета с помощью горячего кожуха, температура контролировалась термостатом ( $\pm 1$  °C). Давление контролировалось дозирующим клапаном. Обедненный шрот гриба *Inonotus obliquus* массой 50 г загружался в однолитровый экстрактор и экстрагирован sc-CO<sub>2</sub> в скорости потока жидкости 250 г/мин. Доля модификатора (со-растворителя) EtOH составила 4,5 %. Для получения сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта были заданы следующие экстракционные условия: давление сверхкритического диоксида углерода в диапазоне 30–60 МПа; температурные режимы 40–70 °C; время воздействия 2 ч. Экстракт был собран в сепараторе, сообщающемся с дозирующим клапаном.

Общее микробное число (ОМЧ) экстрактов определяли по ГОСТ 10444.15-94. Количество дрожжей и плесневых грибов в экстрактах определяли по ГОСТ 10444.12-2013.

Для проведения анализа на токсичность по методике, указанной в пособии авторов [12], готовили ряд пробирок (в 3-х параллелях), содержащих 2 мл углеводно-солевой дрожжевой среды (УСД), в которые внесли по 1 мл сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта или 0,5 % к массе среды УСД сухого экстракта. Контролем в этом эксперименте служат 3 параллельных пробирки с 2 мл УСД, в которые добавляется 1 мл физиологического раствора. В каждую пробирку добавляют по 0,2 мл 3–6 суточной культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и оставляют при температуре от 20 до 25 °C в защищенном от прямых солнечных лучей

Таблица 1. Микробиологические показатели экстрактов гриба *Inonotus obliquus*Table 1. Microbiological indicators of extracts of *Inonotus obliquus*

Продолжительность хранения экстракта, мес.	Микробиологический показатель			
	ОМЧ, КОЕ/мл		Плесневые грибы и дрожжи, КОЕ/мл	
	водный экстракт	сверхкритический CO <sub>2</sub> -экстракт	водный экстракт	сверхкритический CO <sub>2</sub> -экстракт
0	4	0	3	0
6	4	0	5	0
12	5	0	4	0
18	8	0	5	0
24	8	2	8	0
30	12	0	11	0
36	10	0	15	0

месте. Через 0,25–24 ч учитывают эффект биопробы в капле, взятой стерильной пастеровской пипеткой, на предметном стекле под микроскопом путем просмотра всего объема капли и всех ее слоев.

Для определения относительной биологической ценности (ОБЦ) по методике, указанной в [12], перед анализом в исследуемых пробах определяют содержание белка (%) любым доступным методом. Для сопоставимости результатов расчет навески гомогенизированной пробы при внесении в среду осуществляется таким образом, чтобы в 1 мл содержалось 0,3 мг азота.

Навеску гомогенизированной пробы исследуемого образца в количестве 0,6 мг по азоту помещают в ступку или гомогенизатор, добавляют 2 мл УСД, растирают и перемешивают пестиком в течение 1–2 мин.

Для повышения достоверности результатов и минимизации потерь образца массу навески и количество среды следует увеличить в 5–50 раз.

Каждый образец готовят в 3–5 повторностях. В каждую пробирку вносят по 2 мл полученной суспензии продукта, содержащей 0,6 мг азота, и закрывают резиновыми пробками. Контролем в эксперименте служат 3–5 пробирок, в каждую из которых вносят по 2 мл суспензии стандартного продукта (количество азота также составляет 0,6 мг). Для инактивации посторонней микрофлоры опытные и контрольные пробирки прогревают в воде при температуре 80 °С в течение 20 мин.

В пробирки с суспензией продукта после охлаждения до температуры не выше 25 °С в стерильных условиях вносят пастеровской пипеткой или дозатором по 0,2 мл 3–6-суточной культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, выращенных на пептонной среде. Посевы оставляют в термостате при 25 °С на 4–6 суток, ежедневно встряхивая по 3 раза для лучшей аэрации среды.

Для исключения возможного токсического действия ежедневно из контрольных и опытных проб под микроскопом в «раздавленной капле»

оценивают движение, размеры и морфологические характеристики клеток инфузорий. По истечении периода инкубирования клетки инфузорий обездвиживают фиксирующим раствором (йодный раствор по Бурке) и производят их подсчет в счетной камере Горяева.

#### Результаты и их обсуждение

Все продукты переработки сырья растительного происхождения подвержены ухудшению качества в процессе обработки. Поэтому проблема микробной контаминации должна быть полностью решена. Выбираемый способ снижения уровня микробного загрязнения должен быть максимально щадящим, чтобы не повлечь за собой нежелательные изменения в химическом составе и физических свойствах, влияющие на качество готового экстракта. Кроме того, необходимо доказать отсутствие опасных остаточных продуктов после применения того или иного способа деконтаминации.

Так как вода представляет собой благоприятную среду для развития микроорганизмов, то срок и условия хранения жидких экстрактов без консервантов должны быть обоснованы и подтверждены данными по стабильности. В данном исследовании микробиологический анализ проводился путем определения общего микробного числа (ОМЧ) и количества плесневых грибов и дрожжей.

В таблице 1 приведены результаты микробиологического анализа водного и сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *Inonotus obliquus*. Полученные данные для таких показателей, как ОМЧ и количество плесневых грибов и дрожжей, показывают низкую микробную обсемененность водного экстракта и микробную деактивацию сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта.

Производственный процесс получения водного экстракта путем кипячения обеспечивает снижение количества микроорганизмов. Данные микробиологического анализа характеризуют низкую

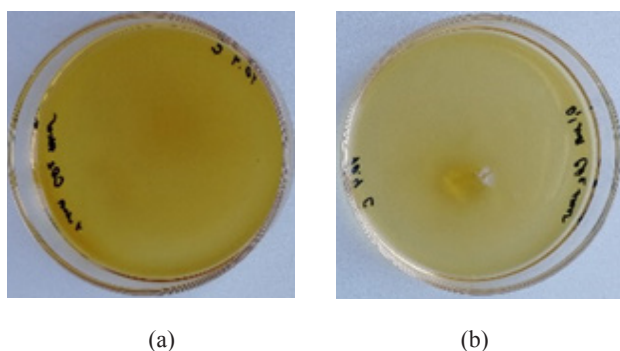


Рисунок 1. Чашки Петри с посевом сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *Inonotus obliquus* (36 мес. хранения) на питательные среды (5-е сутки культивирования): а – GRM-агар; б – агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом

Figure 1. Petri dishes with supercritical CO<sub>2</sub>-extract of *Inonotus obliquus* (36 months of storage) in nutrient media (5 days of cultivation): а – GRM-agar; б – Sabouraud agar with dextrose and chloramphenicol

обсемененность как на начальном этапе, так и в конце эксперимента: 4–10 КОЕ/мл. Однако указанный способ получения представляет эффективность в отношении вегетативных форм микроорганизмов, о чем свидетельствует увеличение количества микроорганизмов во время хранения экстракта.

В отличие от водного экстракта, полное удаление таких загрязнителей, как плесневые грибы и дрожжи, отмечено для образца, полученного методом сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода (рис. 1). Представленные результаты испытания образцов экстрактов и отсутствие роста на чашках Петри свидетельствуют о высокой микробиологической чистоте сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *Inonotus obliquus*, сохраняющейся на протяжении всего срока хранения.

Экстракция углерода диоксидом позволяет сократить общее количество аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов за счет сочетания действия растворителя с воздействием

высокого давления, которые сокращают уровень содержания микроорганизмов.

Механизм бактерицидного действия диоксида углерода был описан авторами [10, 16, 17]. Инактивацию микроорганизмов сверхкритическим диоксидом углерода связывают с необратимыми повреждениями клеточной мембраны микроорганизмов и инактивацией ключевых ферментов в клетке. Сжиженный диоксид углерода обладает бактерицидными и антиоксидантными свойствами, что создает возможность извлечения термо- и оксиллабильных веществ, повышающих биологическую ценность экстрактов. В процессе хранения нами не наблюдалось увеличения уровня микробной обсемененности в сверхкритическом CO<sub>2</sub>-экстракте, что показывает эффективность инактивации как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов.

Полученные результаты подтверждают бактерицидные свойства экстрактов гриба *Inonotus obliquus* в отношении контаминирующей микрофлоры за счет содержания в своем компонентном составе тритерпенового спирта – бетулина, обладающего антибактериальными свойствами (рис. 2). Идентификацию вещества проводили методом tandemной масс-спектрометрии на масс-спектрометре «amaZon SL» («BRUKER DALTONIKS», Германия).

В результате проведенного испытания образцов экстрактов гриба *Inonotus obliquus*, полученных водной и сверхкритической флюидной экстракцией, установлено, что в течение всего испытываемого срока хранения показатели, характеризующие микробную обсемененность экстрактов, оставались на низком уровне. Также отмечена микробная деактивация диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии загрязнителей экстракта.

Испытание полученных нами экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на токсичность проводили на суточной культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Оценивали следующие признаки: поведение и характер роста клеток,

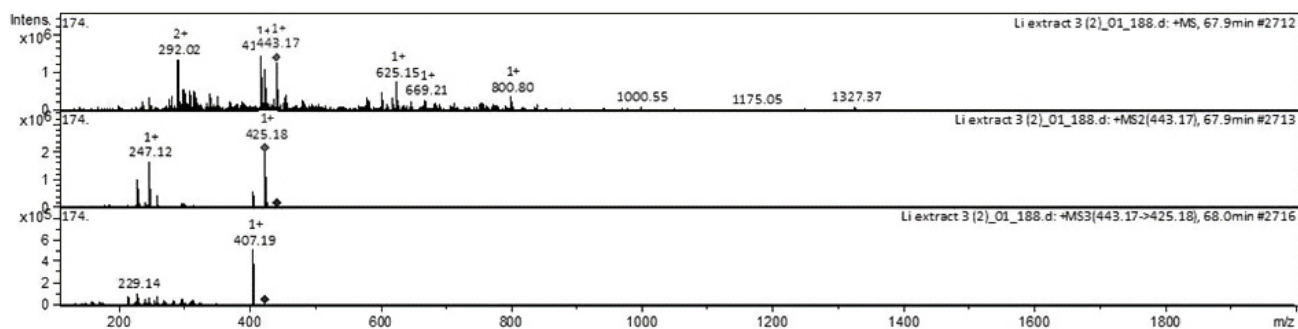
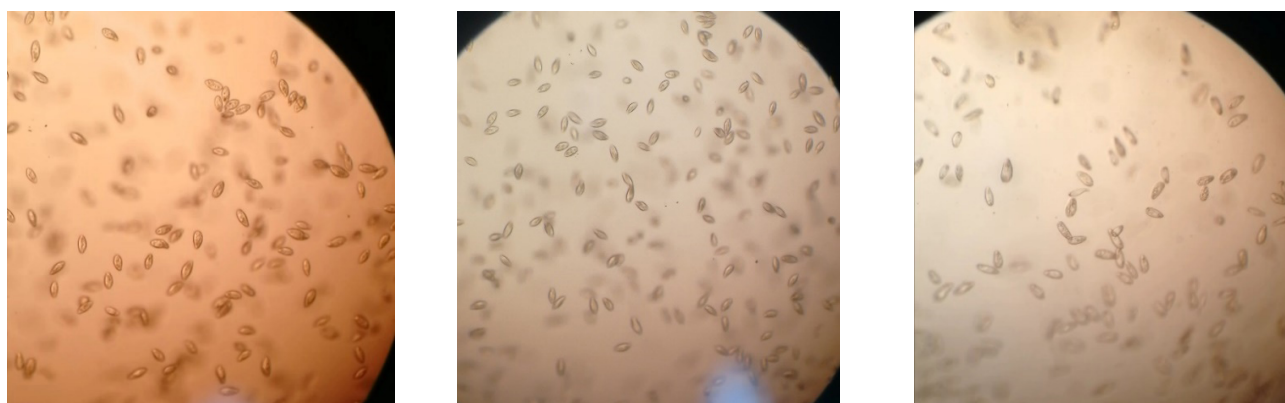


Рисунок 2. Масс-спектр бетулина, идентифицированного в сверхкритическом CO<sub>2</sub>-экстракте *Inonotus obliquus*

Figure 2. Mass spectrum of betulin identified in supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Inonotus obliquus*



(a) (b) (c)

Рисунок 3. Нативный препарат инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в эксперименте исследования токсичности экстрактов гриба *Inonotus obliquus* (24 ч инкубирования): а – водный экстракт; б – сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракт; с – контроль физраствор

Figure 3. Native preparation of ciliates *Tetrahymena pyriformis* in the toxicity test of *Inonotus obliquus* extracts (24 h of incubation): a – aqueous extract; b – supercritical CO<sub>2</sub> extract; c – control saline

подвижность, размер и форму клеток, замедление роста, незначительные деформации инфузорий и число погибших клеток. В ходе эксперимента установлено отсутствие угнетения подвижности и роста. Форма клеток инфузорий овальная, ровная, деформация клеточных стенок не обнаружена. Это свидетельствует об отсутствии токсичного действия исследуемых экстрактов. Для опытных и для контрольного образцов характерна активная подвижность инфузорий, отмечен положительный фототаксис, гибель клеток не зафиксирована (рис. 3). Оценка степени токсичности экстрактов позволяет

заключить, что экстракты не оказывают токсичного действия на живой организм и безопасны для внесения в пищевые продукты.

Для выявления возможного накопления токсического эффекта и отдаленных отрицательных явлений воздействия экстрактов на организм проводили дальнейшую инкубацию до 7 суток (168 ч). В течение всего срока инкубирования токсического или мутагенного действия экстрактов на культуру инфузорий *Tetrahymena pyriformis* не было выявлено. Результаты наблюдений отражены на рисунке 4. Наибольший прирост популяции инфузорий наблюдался в образце с внесенным сверхкритическим CO<sub>2</sub>-экстрактом гриба *Inonotus obliquus*.

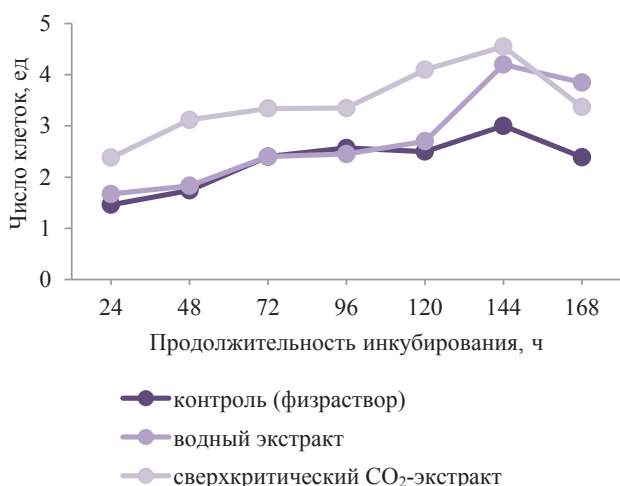


Рисунок 4. Рост тест-культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis* с добавлением экстрактов гриба *Inonotus obliquus* в эксперименте исследования токсичности

Figure 4. Test culture of *Tetrahymena pyriformis* after adding extracts of *Inonotus obliquus* during the toxicity test



Рисунок 5. Относительная биологическая ценность (ОБЦ) экстрактов гриба *Inonotus obliquus* (контроль – казеин)

Figure 5. Relative biological value of *Inonotus obliquus* extracts (casein control)

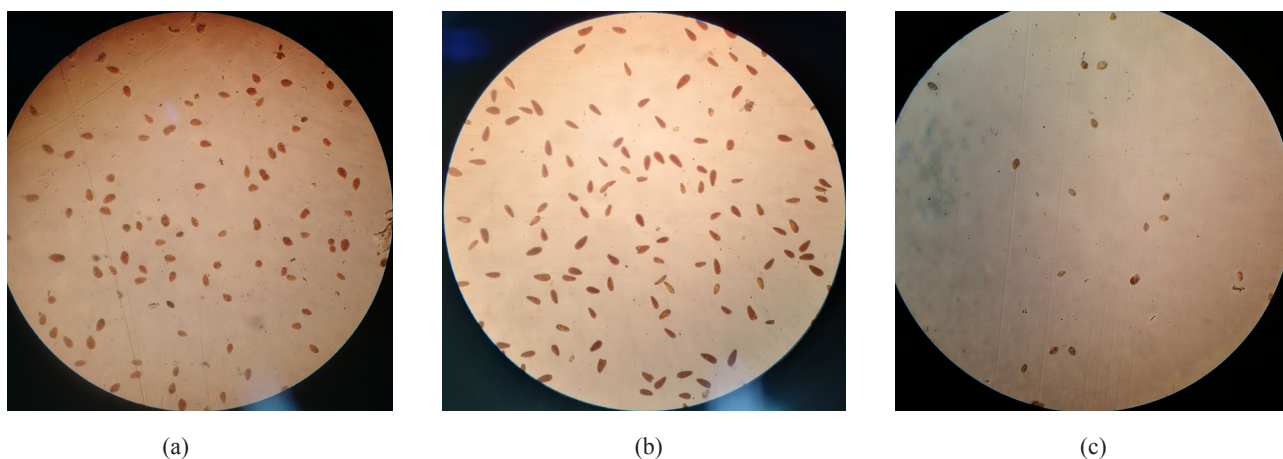


Рисунок 6. Зафиксированный препарат инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в эксперименте определения ОБЦ экстрактов гриба *Inonotus obliquus*: а – водный экстракт; б – сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракт; с – контроль казеин

Figure 6. Fixed preparation of *Tetrahymena pyriformis* during the test in the relative biological value of *Inonotus obliquus* extracts: a – aqueous extract; b – supercritical CO<sub>2</sub> extract; c – casein control

Для последующей оценки влияния экстрактов гриба *Inonotus obliquus* на биологическую ценность было проведено определение относительной биологической ценности (ОБЦ) экстрактов гриба. В качестве контрольного образца был использован белок казеин.

Установлено, что ОБЦ экстрактов гриба *Inonotus obliquus* превышает показатель относительной биологической ценности стандартного белка – казеина (рис. 5). Наибольший показатель ОБЦ установлен для образца сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта на 3-е сутки инкубации и превысил ОБЦ казеина на 265,3 %. При рассмотрении динамики изменения ОБЦ в течение эксперимента зафиксировано снижение показателя ОБЦ, по сравнению с контролем, как для водного 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 расходом питательного субстрата.

В результате оценки морфологических показателей тест-объекта на зафиксированном препарате отмечены более крупные размеры клеток инфузорий, культивируемых в среде с добавлением сверхкритического CO<sub>2</sub>-экстракта гриба *Inonotus obliquus* (рис. 6). Это связано с компонентным составом CO<sub>2</sub>-экстракта термо- и оксилабильные соединения которого оказывают стимулирующее влияние на рост и размножение инфузорий в опытном образце.

#### Выводы

В результате проведенного исследования установлено, что сверхкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода, по сравнению с водной экстракцией, способствует инактивации

микробных контаминантов исходного сырья гриба *Inonotus obliquus* и обеспечивает стабильность показателей микробиологической безопасности полученного экстракта на протяжении представленного срока хранения. Водная экстракция представляет эффективность в отношении вегетативных форм микроорганизмов, о чем свидетельствует увеличение количества микроорганизмов во время хранения экстракта. В течение всего срока инкубирования токсического или мутагенного действия экстрактов на культуру инфузорий *Tetrahymena pyriformis* не было обнаружено. Высокий показатель ОБЦ и наибольший прирост популяции инфузорий наблюдался в образце с внесенным сверхкритическим CO<sub>2</sub>-экстрактом гриба *Inonotus obliquus*.

Таким образом, для испытуемых экстрактов гриба *Inonotus obliquus* характерна стабильность и прослеживаемость микробиологических показателей в процессе хранения, отмечены высокие показатели ОБЦ и установлена токсикологическая безопасность методом биотестирования на инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Это позволяет использовать водный и сверхкритический CO<sub>2</sub>-экстракты в качестве компонентов пищевых систем.

#### Критерии авторства

Н. Г. Ли осуществляла планирование и постановку экспериментального исследования, проводила анализ результатов и их статистическую обработку, формулировала выводы. Ею были написаны такие разделы статьи, как «введение», «объекты и методы исследования» и «выводы». Т. К. Каленик осуществляла научное руководство исследованием, обобщала полученные данные, выводила закономерности и формулировала основные выводы.

Ею написаны раздел статьи «результаты и их обсуждение» и откорректированы выводы.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с этой статьей.

#### Contribution

N.G. Li designed and organized the experimental study, analyzed the results, statistically processed the

obtained data, and formulated conclusions. N.G. Li is also responsible for the Introduction, Objects and Methods, and Conclusions. T.K. Kalenik supervised the research, summarized the data, deduced patterns, and formulated the main conclusions. T.K. Kalenik wrote the Results and Discussion paragraph and proofread the conclusions.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests related to the publication of this article.

#### Список литературы

1. Isolation, identification, and biological characteristics of a wild chaga mushroom / P. Han, Y. Bian, Q. Chen [et al.] // Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. – 2018. – Vol. 24, № 3. – P. 576–582. <https://doi.org/10.19675/j.cnki.1006-687x.2017.08036>.
2. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom” / J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Nikolić [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2015. – Vol. 162. – P. 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.069>.
3. Shahzad, F. The antiviral, anti-inflammatory effects of natural medicinal herbs and mushrooms and SARS-CoV-2 infection / F. Shahzad, D. Anderson, M. Najafzadeh // Nutrients. – 2020. – Vol. 12, № 9. <https://doi.org/10.3390/nu12092573>.
4. Сысоева, М. А. Высокоактивные антиоксиданты на основе гриба *Inonotus obliquus*: автореф. дис. ... д-р хим. наук: 15.00.02 / Сысоева Мария Александровна. – Казань, 2009. – 32 с.
5. 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 [и др.] // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2020. – Т. 9, № 1 (49). – С. 105–110.
6. Evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of *Pulicaria jaubertii* extract obtained by supercritical and conventional methods / Q. A. Al-Maqtari, A. A. Mahdi, W. Al-Ansi [et al.] // Journal of Food Measurement and Characterization. – 2021. – Vol. 15, № 1. – P. 449–456. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00652-5>.
7. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of compounds from different aerial parts of *Senecio brasiliensis*: Mathematical modeling and effects of parameters on extract quality / T. C. Confortin, I. Todero, N. I. Canabarro [et al.] // Journal of Supercritical Fluids. – 2019. – Vol. 153. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104589>.
8. Antioxidant and antimicrobial assessment of licorice supercritical extracts / S. E. Quintana, C. Cueva, D. Villanueva-Bermejo [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2019. – Vol. 139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111496>.
9. Antioxidant activity and total polyphenols content of camellia oil extracted by optimized supercritical carbon dioxide / W. Wang, S. Han, Z. Jiao [et al.] // JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2019. – Vol. 96, № 11. – P. 1275–1289. <https://doi.org/10.1002/aocs.12285>.
10. Supercritical carbon dioxide applications in food processing / W. Wang, L. Rao, X. Wu [et al.] // Food Engineering Reviews. – 2020. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09270-9>.
11. Габидова, А. Э. Анализ рисков в производстве лекарственных препаратов / А. Э. Габитова, В. А. Галынкин // Формулы Фармации. – 2019. – Т. 1, № 1. – С. 32–37. <https://doi.org/10.17816/phf18552>.
12. Шульгин, Ю. П. Ускоренная биотис оценка качества и безопасности сырья и продуктов из водных биоресурсов / Ю. П. Шульгин, Л. В. Шульгина, В. А. Петров. – Владивосток : Изд-во ТГЭУ, 2006. – 123 с.
13. Maurya, R. Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review / R. Maurya, A. K. Pandey // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058>.
14. Toropov, A. A. “Ideal correlations” for the predictive toxicity to *Tetrahymena pyriformis* / A. A. Toropov, A. P. Toropova, E. Benfenati // Toxicology Mechanisms and Methods. – 2020. – Vol. 30, № 8. – P. 605–610. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1801928>.
15. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 63. *Inonotus obliquus*. Чага. – М. : Медицина, 1990. – 397 с.
16. Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications – A review / T. Arumugham, K. Rambabu, S. W. Hasan [et al.] // Chemosphere. – 2021. – Vol. 271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129525>.
17. A new era for sterilization based on supercritical CO<sub>2</sub> technology / N. Ribeiro, G. C. Soares, V. Santos-Rosales [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials. – 2020. – Vol. 108, № 2. – P. 399–428. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34398>.



18. Касьянов, Г. И. Особенности экстракции ценных компонентов из эфиромасличного сырья сжиженным и сжатым диоксидом углерода / Г. И. Касьянов, Э. Ю. Мишкевич // Научные труды КубГТУ. – 2019. – № 1. – С. 367–377.

### References

1. Han P, Bian Y, Chen Q, Zhang G, Zhang Y, Li B, et al. Isolation, identification, and biological characteristics of a wild chaga mushroom. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 2018;24(3):576–582. <https://doi.org/10.19675/j.cnki.1006-687x.2017.08036>.
2. Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Fernandes Â, Barros L, Calhella RC, et al. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom”. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;162:323–332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.069>.
3. Shahzad F, Anderson D, Najafzadeh M. The antiviral, anti-inflammatory effects of natural medicinal herbs and mushrooms and SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*. 2020;12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092573>.
4. Sysoeva MA. Vysokoaktivnyye antioksidanty na osnove griba *Inonotus obliquus* [Highly active antioxidants based on *Inonotus obliquus*]. Dr. chem. sci. diss. Kazan: Kazan State Technological University; 2009. 32 p.
5. Li NG, Kalenik TK, Motkina EV, Motkina MA. The study of the component composition of CO<sub>2</sub> extract of *Inonotus obliquus* birch mushroom by chromat-mass spectrometry. *XXI Century: Resumes of the Past and Challenges of the Present Plus*. 2020;9(1)(49):105–110. (In Russ.).
6. Al-Maqtari QA, Mahdi AA, Al-Ansi W, Mohammed JK, Wei M, Yao W. Evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of *Pulicaria jaubertii* extract obtained by supercritical and conventional methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(1):449–456. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00652-5>.
7. Confortin TC, Todero I, Canabarro NI, Luft L, Ugalde GA, Neto JRC, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of compounds from different aerial parts of *Senecio brasiliensis*: Mathematical modeling and effects of parameters on extract quality. *Journal of Supercritical Fluids*. 2019;153. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104589>.
8. Quintana SE, Cueva C, Villanueva-Bermejo D, Moreno-Arribas MV, Fornari T, García-Risco MR. Antioxidant and antimicrobial assessment of licorice supercritical extracts. *Industrial Crops and Products*. 2019;139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111496>.
9. Wang W, Han S, Jiao Z, Cheng J, Song J. Antioxidant activity and total polyphenols content of camellia oil extracted by optimized supercritical carbon dioxide. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2019;96(11):1275–1289. <https://doi.org/10.1002/aocs.12285>.
10. Wang W, Rao L, Wu X, Wang Y, Zhao L, Liao X. Supercritical carbon dioxide applications in food processing. *Food Engineering Reviews*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09270-9>.
11. Gabidova AEh, Galynkin VA. A unified and simplified flow diagram of the production of active pharmaceutical ingredients and the finished dosage form. *Pharmacy Formulas*. 2019;1(1):32–37. <https://doi.org/10.17816/phf18552>.
12. Shul'gin YuP, Shul'gina LV, Petrov VA. Uskorennyaya biotis otsenka kachestva i bezopasnosti syr'ya i produktov iz vodnykh biore-surov [Accelerated biotis assessment of the quality and safety of raw materials and products from aquatic biological resources]. Vladivostok: Izd-vo TGEHU; 2006. 123 p. (In Russ.).
13. Maurya R, Pandey AK. Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review. *Science of the Total Environment*. 2020;741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058>.
14. Toropov AA, Toropova AP, Benfenati E. “Ideal correlations” for the predictive toxicity to *Tetrahymena pyriformis*. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2020;30(8):605–610. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1801928>.
15. Gosudarstvennaya Farmakopeya SSSR. Vyp. 2: Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. 63. *Inonotus obliquus*. Chaga [State Pharmacopoeia of the USSR. Issue 2: General methods of analysis. Medicinal herbal raw materials. 63. *Inonotus obliquus*. Chaga]. Moscow: Meditsina; 1990. 397 p. (In Russ.).
16. Arumugham T, Rambabu K, Hasan SW, Show PL, Rinklebe J, Banat F. Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications – A review. *Chemosphere*. 2021;271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129525>.
17. Ribeiro N, Soares GC, Santos-Rosales V, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA, et al. A new era for sterilization based on supercritical CO<sub>2</sub> technology. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. 2020;108(2):399–428. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34398>.
18. Kasyanov GI, Mishkevich EYu. Features of extraction of valuable components from etherosilic raw material, liquefied and compressed carbon dioxide. *Scientific works of the Kuban State Technological University*. 2019;(1):367–377. (In Russ.).