СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ
София 1407, бул. "Черни връх" № 53, тел: 02/ 8681363, e-mail: director@ikht.bg, www.ikht.bg

НИКОЛАЙ ЯНКОВ СОЛАКОВ

Разработване на технология за биопродукти на основата на органични източници

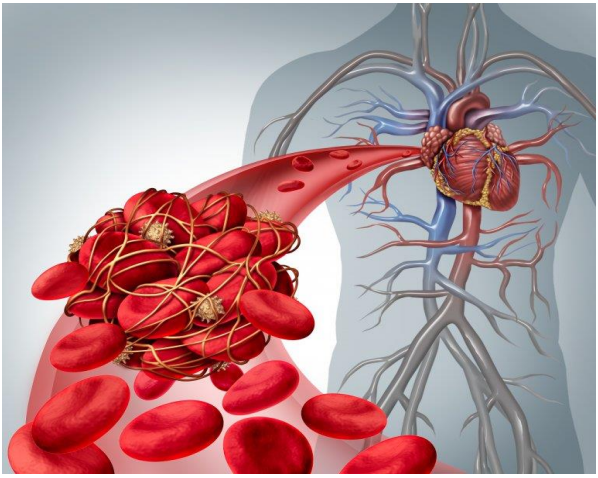
АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна област 5. Технически науки

Професионално направление 5.12. Хранителни технологии,

Научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини).



СОФИЯ, 2023

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от заседание на Разширен научен съвет към отдел „Криобиология и биологично активни вещества“, Институт по криобиология и хранителни технологии, София, проведен на 24.03.2023г.
Разработката включва разделите: въведение, литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщени изводи, литература, приложение 1, общо страници. Цитирани са литературни източника (1 на кирилица и на латиница). В дисертацията са включени таблици и фигури.

Номерацията на разделите, фигурите и таблиците в автореферата съответстват на тези в дисертацията.

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ
София 1407, бул. "Черни връх" № 53, тел: 02/ 8681363, e-mail: director@ikht.bg, www.ikht.bg

НИКОЛАЙ ЯНКОВ СОЛАКОВ

РАЗРАБОТВАНЕ НА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА БИОПРОДУКТИ НА ОСНОВАТА НА ОРГАНИЧНИ ИЗТОЧНИЦИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна област 5. Технически науки

Професионално направление 5.12. Хранителни технологии,

Докторска програма „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини).

Научни ръководители:

проф. д-р Илиана Борисова Начева

доц. д-р Илияна Анастасова Петрова

Научно жури:

доц. д-р Мария Дончева Донева- Николова

доц. д-р Светла Максимова Дянкова

проф. д-р Ангел Иванов Ангелов

проф. дтн Цонка Иванова Годжевъргова

проф. д-р Настя Василева Иванова

София, 2023г.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Дисертационният труд е насочен към разработване на технология за получаване на биологично активни комплекси от диворастящи висши гъби и микробиални култури и включването им във функционален продукт с насочено здравословно действие.

В природата са известни хиляди представители на висшите диворастящи гъби, от които около 600 вида са изпитвани за въздействието им върху здравето на човека. Установено е, че всички те проявяват имуномодулиращи свойства. В гъбният матрикс се съдържат няколко основни групи биологично активни вещества, като терпени, стероли, функционални полизахариди, мощни антиоксиданти и инхибитори. В зависимост от състава на биологичната матрица се установяват и допълнителни здравословни ефекти, което определя научния интерес към използването им като субстрат за получаване на биопродукти с разнообразна функционална активност.

Обект на разработката са видовете *Ganoderma lucidum* (Reishi) и *Cordyceps sinensis*, които са най-добре изучени по отношение на биологично активния им състав. Притежават мощен адаптогенен ефект (въздействие върху повече от 300 биохимични процеси и функции.

Проведени са експерименти за получавани на биологично активни екстракти чрез ферментационна хидролиза на гъбения субстрат с щам продуцента *Bacillus subtilis*. Този микроорганизъм е един от малкото устойчиви на различни условия и добре изучен продуцент за промишлено използване. Ензимите, продуцирани от различните щамове *Bacillus subtilis* намират широко приложение в различни области, включително хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост.

При конвенционалния метод за получаване на протеолитични и фибринолитични ензими, при култивирането на *Bacillus subtilis* в състава на хранителните среди се включват бобови култури с високо съдържание на белтъчни компоненти. Такава хранителна среда осигурява условия за продуциране на високомолекулни протеолитични ензими, които не могат да преодолеят голяма част от биологичните бариери в организма. Влагането на гъбен субстрат в хранителната среда на микробиалния щам ще осигури продуцирането на ензими с различни молекулните маси и специфично биологично действие. Акцентът в разработването на настоящия дисертационен труд е насочен към постигане на следните иновативните елементи:

- Оптимизиране на технологията на култивиране на диворастящи медицински гъби чрез вариране състава на хранителната среда и условията на култивиране.
- Комбинирано използване на гъбни и микробиални екстракти с цел подобряване биологично активното действие на крайния продукт.
- Създаване на нова технология, при която хранителната среда за култивиране на микробиалния щам е част от състава на крайния продукт и е източник на протеолитични, фибринолитични, целулазни, глюканазни, хитиназни ензими и други биологично активни компоненти.

Прилагането на комбинираните биотехнологични подходи за използването на биологично активни компоненти от естествени органични източници, при което се очаква получаване на краен продукт с висока биологична активност, определя актуалността на настоящия дисертационен труд и приложимостта на получените резултати в практиката.

II. ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

- Получените данни доказват огромния потенциал на медицинските висши гъби, като източник на биологично активни вещества и възможности за приложението им.
- Установено е, че тези организми могат да извличат максимални количества нутриенти от въздуха, водата, почвата, както и паразитирайки в гостоприемници от растителен вид и някои членестоноги, представители на инсектите. Тази способност им осигурява концентрацията на голямо количество биологично активни вещества, налични в мицела, гъбното тяло и спорите.
- Способността на гъбите да се разпространяват чрез спори или чрез мрежа от нишковидни структури, наречени хифи, им осигурява безпрепятствено завземане на огромни територии с благоприятни условия за живот. Развивайки се на различни местообитания, гъбите от един и същ вид използват разнообразни хранителни субстрати и продуцират различни биологично активни вещества.
- Контролираното отглеждане на медицински гъби, както на открито, така и в лабораторни условия осигурява различни възможности за получаване на определен състав на активните компоненти в екстрактите от медицински гъби.
- Отглеждането на открито, но в контролирана среда осигурява максималното натрупване на биологично активни вещества от всички групи, като получения екстракт е с максимално близък състав до този на получен от диворастящи представители.
- Чрез промяна на метода за отглеждане в контролирана среда се дава възможност за постигане на голямо количество от желаната биологично активна субстанция.
- От направения обзор се установи, че с най-висок потенциал, с оглед постигане на най-висок добив на биологично активни вещества са представителите на родовете *Ganoderma* и *Cordyceps.*
- От род *Ganoderma* са избрани видовете *Ganoderma lucidum* и *Ganoderma neo-japonicum*, а от род *Cordyceps* съответно *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris.*
- *Cordyceps sinensis* осигурява разнообразие от биологично активни вещества, повлияващи циркулацията на кръвта и подпомагащи колагеновата продукция. *Cordyceps militaris* е с доказано високо съдържание на прекурсори на аденозин имащи благоприятно въздействие върху енергията на клетката, което е в основата за подобряване

циркулацията на кръвта. *Ganoderma lucidum* е една от най-добре проучените медицински гъби с доказан богат биологично активен екстракт. *Ganoderma neo-japonicum* е една от най-малко изследваните лабораторно отглеждани видове от род *Ganoderma,* което дава възможност за експерименти: разработване на методи на екстракция и създаване на технология за производство на функционален продукт с разнообразни богати по състав крайни дозови форми.

- Установено е, че щам продуцентът *Bacillus subtilis* е подходящ за осигуряване на богат ензимен комплекс с протеолитично действие, включващ пептиди с различна молекулна маса, необходим за състава на разработвания продукт.
- *Bacillus subtilis* е добър продуцент на хитиназни, целулазни и бетаглюканзни ензими, което го прави подходящ за хидролизиране на клетъчните структури в гъбните суровини. Успешно може да се прилага в биотехнологични процеси за получаване на екстракти от гъбни и растителни източници.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ
ЦЕЛ

- Целта на дисертационния труд е разработване на технология за получаване на биопродукти на основата на органични източници

ЗАДАЧИ

- Култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum*(Reishi), *Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis,* и *Cordyceps millitaris* в експериментални технологични режими.
- Култивиране на микробиална култура *Bacillus subtilis* в различни хранителни среди с оглед получаване на висока обща протеолитична и хитиназна ензимна активност.
- Изпитване на различни биотехнологични методи за получаване на биологично активен екстракт чрез използване на ензими или живи клетки от щам продуцента *Bacillus subtilis*.
- Концентриране на биологично активните вещества в получените екстракти чрез сублимационно сушене.
- Разработване на полупромишлен метод за култивиране на медицинската висша гъба *Cordyceps millitaris* с цел постигане на по-високо съдържание на биологично активното вещество *Cordycepin*.
- Експериментално доказване наличието на биологично активните компоненти: производни на аденозин (кордицепин), пептиди с различна молекулна маса, фенолен профил и антиоксидантна активност в получените екстракти.
- Създаване на рецептурен състав и технология за получаване на крайна твърда дозова форма на функционален биопродукт „*FibrinoZIME”*.

- Изготвяне на технологична документация на функционален биопродукт „*FibrinoZIME",* според изискванията на HACCP и добрата производствена практика.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Материали

4.1.1. Клетъчни култури от висши медицински гъби

Изследванията са проведени със стартерни клетъчни култури от следните висши медицински гъби:

- *Ganoderma lucidum* – Zhejiang Kangzhou Biotechnology Co., Ltd – Jinhua city, Китай;
- *Ganoderma neo-japonicum* OGGNJ100 - Out-Grow USA;
- *Cordyceps sinensis* OGCS100- Out-Grow USA;
- *Cordyceps Militaris* OG1000CM- Out-Grow USA
- *Cordyceps Militaris* – щам продуцент *Shanghai- (*използван при полупромишленият метод) - Zhejiang Kangzhou Biotechnology Co.,Ltd – Jinhua city, Китай

4.1.2. Щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353*.

Използван е щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353,* закупен от НБПМКК

4.1.3. Компоненти, използвани при изготвяне на функционалния продукт: Екстракт от свеж мицел на медицински висши гъби *Cordyceps sinensis, Cordyceps millitaris, Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum,* култивирани в ИКХТ; екстракт от плодно тяло на *Cordyceps millitaris* и екстракт от промишлено отгледан мицел на *Ganoderma lucidum,* екстракт от Natto, растителен изсушен екстракт от *Carica Papaya,* закупени от Zhejiang Kangzhou Biotechnology Co.,Ltd – Jinhua city, Китай; изсушен екстракт от пашкул на *Bombyx mori* L., осигуряващ пептиди с ензимно действие продуцирани от *Serratia* sp. E-15, закупено от Dr. T&T Health UK Ltd; фруктоолигозахариди; минерални добавки: магнезиев бис-глицинат и цинков цитрат; поливинилпиролидон (E1201); микрокристална целулоза; антислепващи агенти: магнезиев стеарат (E 572) и силициев диоксид (E551), закупени от фирма „Ореон Матеев" ЕООД – гр. Карлово.

4.2. Технологични методи

Култивирането на диворастящи висши гъби, включва следните етапи:

- Размножаване на клетъчна култура за получаване на инокулум;
- Формиране на свежа мицелна маса в течна среда (I фаза);
- Формиране на мицелна маса в твърда среда (II фаза);
- Образуване на конгломерати (възли) в мицелната маса;
- Нарастване на възлите;
- Образуване на зачатък на плодното тяло;
- Нарастване на плодното тяло;
- Спорообразуване.

В рамките на провеждания експеримент, търсените биологично активни вещества са в мицелната маса и плодното тяло. С оглед получаване на субстрати с високо съдържание на биологично активни вещества се изисква различен подход на всеки отделен етап от развитието на гъбната култура.

4.2.1. Размножаване на клетъчна култура на медицинските гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* в течна хранителна среда за получване на изходен инокулум.

Стартерните култури са размножени в стандартизирана среда, закупена от Out-Grow USA, предоставена в прахообразен вид. От нея е приготвена течна среда, като в 500 мл дестилирана вода загрята до кипене се разтварят 6 g при бавно хомогенизиране в продължение на 2-3 минути. Разтворът се филтрира през филтърна хартия 40 микрона, а филтратът се стерилизира при налягане 1,02 атмосфери и температура 125ºC за 15 минути. Така приготвените течни среди са разляти в стерилизирани и охладени до температура 20°C стъклени буркани, снабдени с филтър с големина на порите 220 nm за осигуряване на аерация на въздух по време на култивацията. В получената среда след изстиване се инжектира 1 ml стерилна течна клетъчна култура от *Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis и Cordyceps Militaris.*За инукулиране на получената течна среда с клетки от *Ganoderma lucidum* е използван 5 g отгледан мицел върху твърда среда. Оставя се при температура 28ºC за 7 дни без светлина и 7 дни с наличие на светлина. Прорастването на културата се контролира визуално от 4 до 14 ден.

За получаване на висок брой жизнеспособни клетки полученият инокулум се култивира в течна хранителна среда **M0** (таблица 3), след което от него се правят посевки в течна и на твърда хранителна среда.

Таблица 3. Състав на течната хранителна среди g/l.

Субстанция	**Ст. старт.среда/ g**	**Ст. старт.среда/ g**	**Ст. старт.среда/ g**	**Ст. старт.среда/ g**	**M0/ g**	**M0/ g**	**M0/g**	**M0/ g**
Стартова среда	6	6	6	6	-	-	-	-
Декстроза	-	-	-	-	20	20	20	20
Картофено нишесте	-	-	-	-	5	5	5	5
Дрождев автолизат	-	-	-	-	5	5	5	5
FOS	-	-	-	-	5	5	5	5
Кл. култура *Ganoderma neo-japonicum* [ml]	1	-	-	-	1	-	-	-
Кл. култура *Ganoderma lucidum* [g]	-	5	-	-	-	5	-	-
Кл. култура *Cordyceps sinensis* [ml]	-	-	1	-	-	-	1	-
Кл. култура *Cordyceps millitaris* [ml]	-	-	-	1	-	-	-	1
Дестилирана вода доливане до: [ml]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

4.2.2. Култивиране на свеж мицел от медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* в течна хранителна среда (I фаза).

Проведени са серия от експерименти за оптимизиране състава на хранителната среда при култивиране на свежия мицел от висшите гъби, целящи повишаване добива на мицелна маса.

На основата на хранителна **среда М0 (контрола**) са разработени четири варианта на обогатени течни хранителни среди (М1, М2, М3 и М4) със състав, представен в Таблица 4.

Таблица 4. Състав на течни хранителни среди за култивиране на свежа мицелна култура g/l.

Субстанция	М0 контрола	М1	М2	М3	М4
Картофено нишесте [g]	20	20	**20**	20	20
Пептон [g]	-	10	**10**	10	10
Дрождев екстракт [g]	6	6	**6**	6	6
Глюкоза [g]	-	25	**25**	-	-
Декстроза [g]	25	-	-	25	25
FOS [g]	5	5	**5**	5	5
$MgSO_4$ x 7 H_2O [g]	-	0,2	**0,2**	0,2	0,2
Витамин B_1 [g]	-	-	**0,03**	0,03	0,03
KH_2PO_4 [g]	-	-	**0,1**	0,1	0,1
K_2HPO_4 [g]	-	-	**0,2**	0,2	0,2
$FeSO_4$ [g]	-	-	-	-	0,1
Дестилирана вода, до: [ml]	1000	1000	**1000**	1000	1000

Хранителните среди са автоклавирани при налягане 1,02 атмосфери и температура 125ºС за 15 минути, след което са охладени до стайна температура. След стерилизацията средите са разляти в елермайлови колби от 500 ml до обем от 300 ml и са инокулирани с по 5 ml предварително размножена клетъчна култура. Клетъчната култура от *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* е култивирана в хранителните среди (М0, М1, М2, М3 и М4) за 72 часа в клатачен апарат при 28°С, амплитуда на разклащане 100 оборота/минута и отсъствие на светлина, след което е продължено с фотопериод 16 часа светлина (300 lm) към 8 часа без светлина за период от 12 дни.

4.2.3. Количествено определяне нарастването на мицел в течна среда.

На основата на метод за индиректно качествено определяне на нарастването на мицелна култура (Куюмджиева, А. и авт., 2007*)* е разработен аналитичен метод за количествено определяне на нарастването на мицелната култура в течна хранителна среда.

При стартиране нарастването на мицела (72 часа след инокулиране) на всеки 24 часа образувания мицел се отделя чрез филтруване от течната

хранителна среда след темпериране за 30 минути при статични условия при стайна температура. Измерва се обема на отделената хранителна среда.

Изчисления:

- Полученият обем (V_i) от направеното измерване се изважда от обема (V_0) на хранителната среда преди инокулиране.
- Обемът (V_m) на мицелната структура представлява разликата между отделената хранителна среда при измерването и началния обем на хранителната среда преди инокулиране.

$V_m = V_0 - V_i$

Определяне степен на нарастване на мицела:

- Определя се ΔV_m за всеки 24 часа след приключване на тъмния период
- От получените резултати се преизчислява %-то нарастване на мицела спрямо V_{m1} за всеки следващ интервал от 24 часа до края на култивирането.

4.2.3. Култивирането на мицел от медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* върху твърда хранителна среда (II фаза).

Като основа е използвана среда **M0**, като в състава й съдържанието на FOS е заменено с добавяне на агар- агар за формиране на основната твърда среда (S1). От нея чрез добавяне на допълнителни органични източници - пълнозърнест ориз (S2) и стари отлежали дъбови стърготини (S3) са получени обогатени хранителни среди (таблица 5).

Таблица 5. Състав на твърди хранителни среди за култивиране на висши медицински гъби.

Субстанция/ Среди	Вариант S1	Вариант S2	Вариант S3
Декстроза [g]	20	20	20
Картофено нишесте [g]	5	5	5
Дрождев автолизат [g]	5	5	5
Агар-Агар [g]	15	15	15
Ориз [g]	-	200	-
Дъбови стърготини [g]	-	-	200
Инокулум [ml]	5	5	5
Дестилирана вода, до: [ml]	1000	1000	1000

Сухите съставки се разтварят в 1 литър дестилирана вода. Загряват се на водна баня до 60ºС до получаване гелообразна маса. Готовият разтвор се дозира в стъклени буркани от 270 ml в доза от 100 g. Буркните са снабдени с отвор за инокулиране и бактерициден филтър с големина на порите 220 nm. Хранителната среда се автоклавира при налягане 1,02 атмосфери и температура 125ºС за 15 минути и се охлажда до стайна температура. Готовата среда се инокулира с по 5 ml от течния инокулум от клетъчните култури

(*Ganoderma lucidum* KBGL001, *Ganoderma neo-japonicum* GGNJ100, *Cordiceps Sinensis* OGCS100 и *Cordiceps Militaris* OG1000CM, от които се зареждат по 25 проби за всяка отделна култура.

Инокулираните среди се подреждат в инкубатор за контролирано култивиране при 28°C и достъп на естествена светлина.

4.2.4. Полупромишлен метод за култивиране на клетъчна култура от *Cordyceps millitaris* за получаване на плодно тяло и високо съдържание на *Cordycepin*.

Полупромишленият метод обхваща всички етапи на развитие на гъбния организъм от клетъчната култура до получаване на гъбно тяло. Култивирането е проведено в затворено помещение, снабдено с допълнително лед осветление, излъчващо светлина с дължина на вълната λ=450 nm., с възможност на регулиране на фото-периода.

За приготвяне на хранителните среди за култивиране на *Cordyceps millitaris* всички изходни суровини са микронизирани чрез механично смилане и хомогенизирани. Сухите субстанции са смесени в промишлен блендер и разтворени в дейонизирана вода.

Изготвени са 2 хранителни среди (IM-1 и IM-2), които се различават по състава на изходните суровини (Таблица 6).

Таблица 6. Състав на хранителни среди за полупромишлено култивиране на *Cordyceps Militaris – Shanghai*

Субстанция	IM 1, g	IM 2, g
Стрити картофени обелки	30	30
Раздробени обелки от захарна тръстика	30	30
Соев пептон	10	10
Дрождев екстракт	6	6
Глюкоза	20	20
Пълнозърнест ориз	150	150
Черупки от скариди стрити на прах		5
Мононатриев глутамат	-	10
L-глицин	-	5
$(NH4)_2SO_4$	-	20
Азомит	5	5
$MgSO_4 x 7 H_2O$	0,2	0,2
Витамин B1	0,03	0,03
KH_2PO_4	-	0,1
K_2HPO_4	-	0,2
$FeSO4 \cdot 7H2O$	-	0,8
Дестилирана вода, доливане до: [ml]	1000	1000

Средите са разпределени в стъклени буркани с вместимост 750 ml и изолирани от околната среда чрез полимерен филм. Бурканите са

автоклавирани при налягане 1,02 атмосфери и температура 125ºС за 15 минути, след което са охладени до стайна температура. След стерилизацията средите са инокулирани с по 5 ml клетъчен инокулум от *Cordyceps millitaris* – щам продуцент *Shanghai* и поставени на отделни стелажи за последващо наблюдение. През първите 7 дни култивирането е проведено при отсъствие на светлина и с частично ръчно разклащане през интервали от 8 часа, за стартиране растежа на мицела. Процесът на култивиране продължава още 60 дни до получаване на реколта. Получената реколта е събрана изсушена и подложена на екстракция чрез ферментация с *Bacilus subtilis*.
Готовият течен екстракт е филтруван и лиофилизиран.

4.2.5. Размножаване на щам продуцента *Bacilus subtilis*

За възстановяване и намножаване клетките на изходния лиофилизиран щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353* е използвана *стандартна хранителна среда* със следния състав: Екстракт от месо – 10,0; Пептон – 10,0; NaCl – 5,0; Дестилирана вода – до :1000. Средата е стерилизирана в автоклав за 20 минути при 121° С и налягане 1 атмосфера.

В ерленмайрови колби от 500 ml, се поставя 100 ml от предварително стерилизираната стандартна хранителна среда, инукулира се с щам продуцента и се поставя в кръгов клатачен апарат BS/4. Процесът на формирането и нарастването на клетъчна маса се извършва при температура 30°С и амплитуда на разклащане 100 оборота/минута, за период от 24 часа.

Получената клетъчна култура е използвана за последващо инокулиране на хранителните среди.

4.2.5.1. Оптимизиране състава на хранителната среда за култивиране на *Bacilus subtilis NBIMCC 2353* с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки.

Извършена е промяна в стандартната хранителна среда, чрез добавяне на пребиотични и други вещества, имащи отношение към стимулиране размножаването на клетките от инокулума. Използван е автолизиран дрождев екстракт от *Saccharomyces cerevisiae* и екстракт от корен на *Cichorium intybus* (FOS) с високо съдържание на олигозахариди, които са със силно изразени пребиотични свойства, K_2HPO_4 и $MgSO_4$. Получената среда е контрола (К).
Съставът на средите, използвани в експеримента са представени в Таблица 7**.**

Таблица 7. Състав на хранителните среди за култивиране на щам *Bacillus subtilis (g)*

Стандартна среда	Колич.	Контролна среда (К)	Колич.
Екстракт от месо	10 g	Екстракт от месо	10 g
Пептон	10 g	Пептон	10 g
NaCl	5 g	Дрождев екстракт	1,5 g
Дестилирана вода, до: [ml]	1000	FOS	1 g
		NaCl	5 g
		K_2HPO_4	1,3 g
		$MgSO_4$	0,3 g
		Дестилирана вода, до [ml]	1000

От контролата (К) , чрез добавяне на сухи екстракти от култивиран мицел на *Ganoderma lucidum* и *Cordyceps sinensis* са получени 4 варианта на оптимизирани хранителни среди (С1- С4) Таблица 8

Таблица 8. Състав на оптимизирани хранителни среди (g)

Субстанция	Контрола (К), g	С 1, g	С 2, g	С 3, g	С 4, g
Екстракт от месо	10	10	10	10	10
Пептон	10	10	10	10	10
Дрождев екстракт	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
FOS	1	1	1	1	1
NaCl	5	5	5	5	5
K_2HPO_4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
$MgSO_4$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cordyceps sinensis ext.	-	1	2	-	-
Ganoderma lucidum ext.	-	-	-	1	2
Дестилирана вода, до [ml]	1000	1000	1000	1000	1000

В 100 ml от стерилизираните оптимизирани хранителни среди (1- 4) се поставя по 1 ml от инокулума от щам продуцента и се поставя в кръгов клатачен апарат BS/4. Процесът на формирането и нарастването на клетъчната маса се извършва при температура 30°C и амплитуда на разклащане 100 об/мин. Продължителността на култивиране е 24 часа за първия и 72 часа за втория етап. Количеството жизнеспособни клетки е определено по метода на *McFarland* непосредствено преди стартирането на втория епап, последвано от поредни измервания през интервал от 24 часа.

4.2.5.2. Оптимизиране състава на хранителната среда за култивиране на *Bacilus subtilis NBIMCC 2353* с цел повишаване на специфичната ензимната активност:

- **Повишаване на общата протеолитична активност чрез добавяне на нативен говежди колагенов белтък и мицел от *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris***

Към контролната среда (К) са добавени различни количества нативен говежди колаген при pH=8 (Таблица 9).

Таблица 9. Състав на хранителните среди Р1-Р3 (g)

Субстанция	(К), 1ет., g	Р1, g	Р2, g	Р3, g	Р4, g	Р5, g
Екстракт от месо	10	10	10	10	10	10
Пептон	10	10	10	10	10	10
Дрождев екстракт	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
FOS	1	1	1	1	1	1
NaCl	5	5	5	5	5	5
K_2HPO_4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
$MgSO_4$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Нативен говежди колаген	-	40	-	-	-	-
GNJM	-	-	40	-	-	-
GLM	-	-	-	40	-	-
CSM	-	-	-	-	40	-
CMM	-	-	-	-	-	40
Дестилирана вода, дп: [ml]	1000	1000	1000	1000	1000	1000

В 100 ml хранителна среда са инокулирани 1 ml клетъчна култура на *Bacillus Subtilis NBIMCC 2353*. Процесът на формирането и нарастването на клетъчната маса е извършено при температура 30°C и амплитуда на разклащане 100 об/мин. Отделени са аликвоти от всяка хранителна среда за определяне на протеолитичната активност непосредствено преди започване на процеса, на 24-я, на 48-я и 72-я час.

- **Повишаване на хитиназната активност чрез добавяне на нехидролизирани фрагменти от жив мицел на четири вида медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris* и хитин от черупки на скариди**

Към контролната среда (К) са добавени 5 вида различни източници на нативен хитин: нехидролизирани фрагменти от жив мицел на четири вида висши гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris* и хитин от черупки на скариди при pH=8 (Таблица 10).

Таблица 10. Състав на средите CH1-CH5 (g)

Субстанция	(К) g	CH1, g	CH2, g	CH3, g	CH4, g	CH5, g
Екстракт от месо	10	10	10	10	10	10
Пептон	10	10	10	10	10	10
Дрождев екстракт	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
FOS	1	1	1	1	1	1
NaCl	5	5	5	5	5	5
K_2HPO_4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
$MgSO_4$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Chitin from shrimp shells	-	8	-	-	-	-
Ganoderma neo-japonicum (свеж мицел)	-	-	8	-	-	-
Ganoderma lucidum (свеж мицел)	-	-	-	8	-	-
Cordyceps sinensis (свеж мицел)	-	-	-	-	8	-
Cordyceps millitaris (свеж мицел)	-	-	-	-	-	8
Дестилирана вода, до: [ml]	1000	1000	1000	1000	1000	1000

В 100 ml от така получените хранителни среди са инокулирани 1 ml клетки на *Bacillus Subtilis NBIMCC 2353*. Инкубирането е проведено при температура 30°C и амплитуда на разклащане 100 оборота/минута на клатачен апарат BS/4. Отделени са аликвоти от всяка хранителна среда за определяне на хитиназна активност непосредствено преди стартиране на експеримента, на 24-я, на 48-я и 72-я час от началото на процеса.

4.2.6. Получаване на екстракт от мицел чрез ензимно смилане на клетъчната стена

Като изходна суровина е използван мицел от *Gamoderma Lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps millitaris*, култивиран

на твърда хранителна среда (II фаза), за период от шест месеца в контролирани условия в ИКХТ-София.

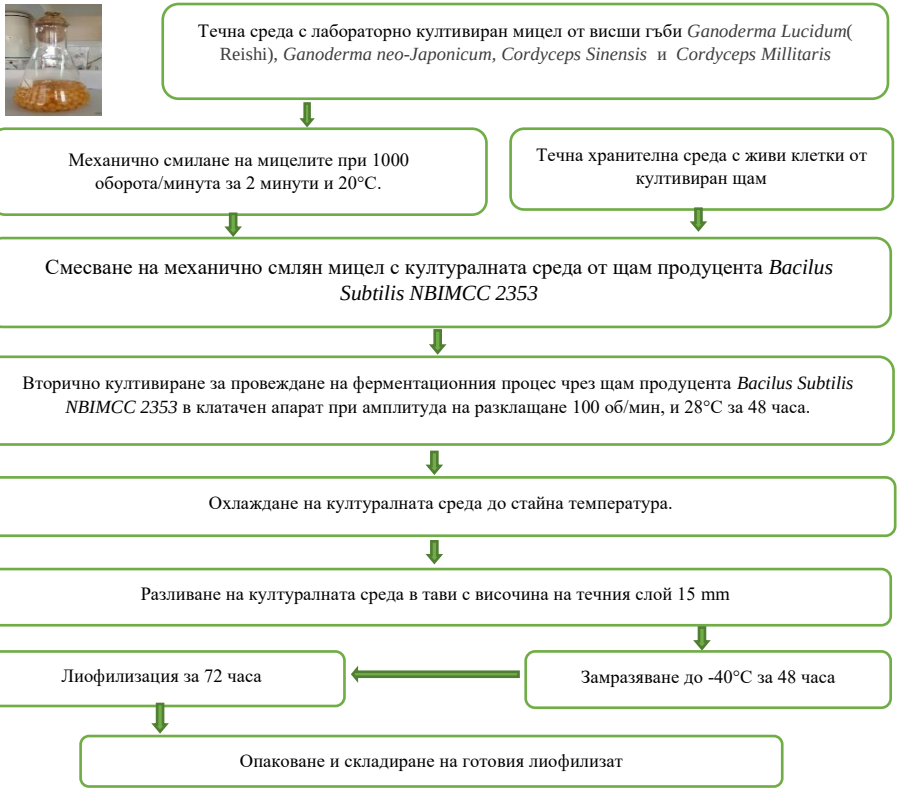
Отделеният гъбен мицел от 5 g е механично нарязан, поставен в 1% р-р на лимонена киселина в H_2O и микронизиран при 10000 оборота/минута за 2 минути. Към получения разтвор са добавени по 0,5 g. от ензимите *DeniLight (Лаказа), Lipopan (Липаза), Fungamyl 4000 SG (Алфа амилаза), Celluclast 1,5 L (Целулаза)* и хомогенизирани в продължение на 24 часа с 600 оборота/минута при температура 20º С. Разтворът е шоково замразен до температура -40º С, след което размразен и при достигане на температура 20º С е добавен ензима *Chitinase* в количество 0,5 g. и хомогенизиран с магнитна бъркалка за 48 ч. при 600 обората/минута. Бистрата част от разтвора е отдекантирана и лиофилизирана. Мътната част от разтвора е сепарирана на тежка и лека фракция чрез центруфугиране при 10000 оборота/минута и температура 7º С за 10 минути. От получената супернатанта е отделена мостра за хроматографско изследване. Леката и тежката фракция от получения комплексен екстракт са лиофилизирани.



Фигура 11. Блокова схема на етапите на обработка за получаване на сух ензимно третиран екстракт

4.2.7. Получаване на екстракт от мицел чрез ферментация с живи клетки.

Използван е мицел от висши медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis и Cordyceps millitaris,* (I фаза) култивиран 21 дена в течна хранителна среда М2.
Технологичния ред за изпълнение е представен на Фигура 12.



Фигура12. Блокова схема на технологичните процеси за получаване на екстракт от лабораторно култивиран мицел получен чрез ферментация с живи клетки.

Култивираният мицел в хранителна среда М2 заедно с течната фракция е подложена на смилане в блендер при 1000 оборота/минута за 2 минути при стайна температура. Финно смляната мицелна среда е смесена с предварително култивирания щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353* в СН1 в съотношение (мицелна среда : бактериална среда) 6:1.

Така получената нова културална течност е разпределена в ерленмаерови колби от 500 ml до заемане на обем от 300 ml. Фотопериодът се изпълнява с естествено осветяване на интервали 12 часа светло/12 часа тъмно. Култивирането е проведено за 48 часа, при 28°C и амплитуда на разклащане 100 оборота/минута, след което колбите са охладени до стайна температура.

Полученият ферментирал течен продукт е разлят в тави от неръждаема стомана с височина на течния слой 15 mm, замразени до температура -40°C за 48 часа и лиофилизирани за 72 часа.

Получения сух лиофилизат е опакован в пакети от трислойно алуминиево фолио с поставени десиканти съдържащи силикагел (SiO_2), за предпазване на продукта от пропусната влага.

4.2.8. Полупромишлен метод за получаване на екстракт от плодно тяло чрез ферментация.

Експериментът е проведен в предприятие за производство на гъбни екстракти, намиращо се в град Джинхуа, Китай.

Използвана е суровина, култивирана 67 дни и представляваща плодно тяло от *Cordyceps millitaris*.

Технологичния ред за изпълнение е представен на Фигура 13.



Течен разтвор на плодно тяло от *Cordyceps Millitaris* във вряла вода и темперирян до стайна температура от 20°C

Механично смилане на плодното тяло при 1000 оборота/минута за 2 минути и 20°C.

Течна хранителна среда с живи клетки от култивиран щам продуцент *Bacilus Subtilis NBIMCC 2353*

Смесване на механично смляното плодно тяло с културалната среда от щам продуцента *Bacilus Subtilis NBIMCC 2353*

Вторично култивиране за провеждане на ферментационния процес чрез щам продуцента *Bacilus Subtilis NBIMCC 2353* в биореактор при разбъркване 60 оборота/минута и 28°C за 48 часа.

Стерилизиране на културалната среда при 120°C и 1 atm за 15 минути

Охлаждане на културалната среда до стайна температура.

Разливане на културалната среда в съдове за промишлена лиофилизация

Замразяване до -40°C

Промишлена лиофилизация

Опаковане и складиране на готовия лиофилизат

Фигура 13. Блокова схема на технологичните процеси за получаване на екстракт от плодно тяло от промишлено култивирана гъбна култура *Cordyceps millitaris* получен чрез ферментация с живи клетки**.**

Получените плодни тела от полупромишленото култивиране в двете хранителни среди IM-1 и IM-2 са разпределени в предварително стерилизирани съдове и са заляти с кипяща вода в съотношение (вода : плодно тяло) 1:1. След темперииране до постигане на 20°C са подложени на смилане в блендер при 1000 оборота/минута за 2 минути. Финно смляната суровина е смесена с предварително култивиран щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353* в CH1 в съотношение (мицелна среда : бактериална среда) 6:1.

Културалната течност е поставена в полупромишлен биореактор с вместимост 1000 L запълнен до обем 350 L. Аерирането на въздушния слой от 650 L (остатъчна вместимост от обема на реактора) е извършено чрез раздвижване на течния слой посредством вградена бъркалка тип „Котва“ със скорост на разбъркване 60 об/минута. Необходимата светлина за култивирането е осигурена чрез монтиран на капака на реактора контролиран LED елемент осигуряващ интезитет на светлинния поток 1000 lm. Култивирането е извършено при фото период 12 часа светлина / 12 часа без светлина за 48 часа, при 28°C. След приключване на култивирането културалната среда е подложена на стерилизация чрез загряване до 120°C за 15 минути и налягане от 1 atm, в самия реактор преди източването му.

Така получена ферментиралата суровина е темперирана до стайна температура.

Културалната среда е замразена до температура -40°C за период от 48 часа, след което е лиофилизирана.

Изготвена е сравнителна оценка на получените суровини култивирани в хранителна среда IM-1 и IM-2 по отношение увеличаване наличието на биологично активната субстанция Cordycepin чрез HPLC анализ.

4.2.9. Сублимационно сушене на получени екстракти от култивиран мицел и плодно тяло от медицински гъби

Процесът на лиофилизация включва етапите:

- *Замразяване* – Замразяването е извършено в хладилни камери с принудителна конвекция на въздушната среда при температура от -25°C до -40°C, в продължение на минимум 24 часа.
- *Сублимационното сушене* е осъществено в сублимационна инсталация на фирмата *“Hochvakuum-TG –16.50”* – Германия, с контактно нагряване на плочите. Преди започване на процеса, плочите на инсталацията се охлаждат до температури от $–20^0$C до - 40^0C, а десублиматорът до температура от $–50^0$C до $–60^0$ C. Температурата на доизсушаване на изследваните проби е в границите от $+25^0$ C до $+32^0$ C, а крайните продукти са с минимално остатъчно влагосъдържание (2,0 – 5,0%). Общата продължителност на сублимационното сушене на пробите е 12-24 часа. Лиофилизираните проби се съхраняват в опаковки от многослойно алуминиево фолио, херметически затворени под вакуум.

4.3. Аналитични методи

4.3.1. Определяне брой на жизнеспособните клетки в културалната течност.

Общият брой жизнеспособни клетки е отчетен по стандартен метод на *McFarland* (*Souza F.A. et al., 2017, Sapiun Z. et al., 2020*). Чрез *спектрофотометър UV- Vis, модел Biochrom Libra S20* е измерена абсорбцията, показваща степента на помътняване в резултат от натрупването на клетки. Разработени са стандартни разтвори чрез смесване на 1% разтвор на $BaCl_2$ с 1% разтвор на H_2SO_4, демонстриращи различна степен на мътност отговаряща на съответен брой клетки в 1 ml в еквивалентен разтвор (Таблица 11).

Таблица 11. McFarland стандарти.

№	McFarland standart	1% $BaCl_2$, (mL)	1% H_2SO_4, (mL)	CFU/ml
TM50	0,5	0,05	9,95	1.5×10^8
TM51	1,0	0,1	9,9	3.0×10^8
TM52	2,0	0,2	9,8	6.0×10^8
TM53	3,0	0,3	9,7	9.0×10^8
TM54	4,0	0,4	9,6	1.2×10^9
TM55	5,0	0,5	9,5	1.5×10^9
TM56	6,0	0,6	9,4	1.8×10^9
TM57	7,0	0,7	9,3	2.1×10^9
TM58	8,0	0,8	9,2	2.4×10^9
TM59	9,0	0,9	9,1	2.7×10^9
TM60	10,0	1,0	9,0	3.0×10^9

За калибриране на метода е използван стандарт TM50 на McFarland, детектиран при дължина на вълната 625 nm, поставен в кювета с 10 mm дължина на преминаващия светлинен поток. При тези условия, стандарт TM50 на McFarland се дедектира със стойност на абсорбция в интервала от 0,08 до 0,1 отговаряща на $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

4.3.2. Определяне на общо фенолно число в екстракти от гъбен мицел и плодно тяло

Съдържанието на общото количество фенолни вещества в екстракти от гъбен мицел и плодно тяло е определено по стандартен метод с Folin-Ciocalteu реагент (Carmona-Hernandez J.C. et al., 2021; Marcelino C.P. et al., 2020). Използван е *спектрофотометър UV- Vis, модел Biochrom Libra S20* и калибрационна крива получена чрез измерване на стандартни разтвори на галова киселина (GA) в концентрации 10, 25, 50, 75 и 100 µg/ml, разтворена в $MeOH_{(50\%)}$.

Пробата е подготвена като разтвор на сух екстракт в $MeOH_{(50\%)}$ с концентрация 100 mg/ml за първия етап от подготовката. Получения разтвор е хомогенизиран в ултразвукова вана до пълното разтваряне на екстракта. Хомогената е разреден с $MeOH_{(50\%)}$ до постигане на концентрация 1 mg/ml, след което е филтруван с филтър с големина на порите 220 nm.

Към 0,5 ml от разтвора с пробата се добавят 3 ml дестилирана вода и 0,25 ml реактив Folin-Ciocalteu. След 2 мин. се добавя 0,75 ml 20% разтвор на натриев карбонат и 0,5 ml дестилирана вода. Реакционната смес се

хомогенизира и се оставя да престои при стайна температура на тъмно за 120 min. Абсорбцията е измерена при 765 nm чрез срещу празна проба, при която разтворът на екстракта се замества с 0,5 ml $MeOH_{(50\%)}$.

4.3.3. Определяне на антиоксидантната активност чрез DPPH радикал спрямо Trolox в екстракти от гъбен мицел и плодно тяло

Към 0,3 ml разтвор на DPPH в метанол (0,2 mmol) се добавят 0,5 ml метанол и 0,5 ml разтвор с концентрация 1mg/ml от изследваните суровини. Смесеният разтвор се хомогенизира и се оставя да престои на тъмно при стайна температура за 120 минути. Абсорбцията се измерва при 517 nm срещу метанол. За стандартната права се използват разтвори на Trolox с концентрация от 0,50 до 3,0 μg/ml (Pankaj S. and Singh R.P., 2013.).

4.3.4. Определяне на протеолитична активност по метода на Ансон

За извършване на анализа са използвани следните реактиви: 0.1M универсален буфер pH 8- три разтвора A,B,C, се смесват в равни количества (разтвор А – 0.1mol/l ледена оцетна киселина, разтвор В - 0.1mol/l ортофосфорна киселина и разтвор С - 0.1mol/l ортоборна киселина); 1N NaOH; 0,3M трихлороцетна киселина (ТХО); 0,5M Na_2CO_3; работен разтвор на реаген на Folin-Ciocalteu.

Методът е основан на хидролиза на белтъка на натриевия казеинат от ензимния препарат, намиращ се в изследвания разтвор, с последваща инактивация на ензима и утаяване на нехидролизирания белтък с (ТХО). За единица протеолитична активност се приема това количество ензим, което за 1min при 30˚С освобождава от натриевия казеинат в количество, съответстващо на 1μmol Тирозин. Като субстрат е използван 2% разтвор на натриев казеинат.

4.3.5. Качествено определяне на разграждането на клетъчната стена на гъбна клетка чрез микроскопско наблюдение.

Микроскопското наблюдение на разграждането на клетъчната стена на гъбна клетка е направено с микроскоп *Accuscope 3012* с монтирана на него камера за заснемане *Micrometrics 5MP*.

4.3.6. Качествено определяне на глюкозамини, като продукти от ензимно разграждане на клетъчната стена на мицел чрез HPLC.

Проведен е HPLC анализ на проба, отделена от получената супернатанта след сепариране на екстракта. Пробата е разредена с MeOH в съотношение 1:5 и обработена с ултразвукова вана до пълно разтваряне. Получения разтвор е пречистен чрез многостепенна филтрация като за целта поетапно са използвани филтърна хартия с големина на порите 100 μm, стъклен филтър с големина на порите 40 μm, стъклен филтър с големина на порите 1 μm, картридж за спринцовка с големина на порите 0,45 μm и картридж за спринцовка с големина на порите 0,2 μm.

Хроматографския анализ е проведен с апарат *HP Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, DAD* [λ=270 nm], RP-C18 [250 mm], изократен режим и течна

фаза със състав: (A) 1% Оцетна киселина (H_2O) : ACN [70:30], (B) MeOH, A:B (90:10). За стандарт е направен разтвор съдържащ, Caffein (10mg/ml) Glucosamin HCL (1 mg/ml), N-Acetil-D-Glucosamin (2 mg./ml) разтворени в подвижна фаза (A) и филтруван с картридж с големина на порите 0,2 μm. За извършване на анализа е направено разреждане с MeOH в съотношение 1:10.

4.3.7. Определяне на молекулна маса на пептиди от ферментирал свеж мицел чрез електрофореза

Електрофорезата е проведена в полиакриламиден гел – SDS-PAGE (по Laemmli, 1971) за определяне на белтъчни фракции. Подготвен е събирателен гел – 6.0% и разделителен гел – 12%. Лиофилизираните проби от мицел от *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* са рехидратирани в дейонизирана вода с концентрация на получения разтвор 200 mg/ml и центрофугирани за 10min при 4ºC и скорост 8000rpm на центрофуга *Beckman*. За окончатено приготвяне на пробите бяха смесени 1 част от супернатантата с 1 част разтворител за проби, съдържащ 0,2M буфер Tris HCl (pH 6,8), SDS, glycerin, DTT и Bromophenol Blue.

Използвана е Система за протеинова електрофореза – *Pharmacia LCB MultiDrive XL,* снабдена с *OmniPAGE WAVE Electrophoresis System* при следните маркери: Sigma marker, Mix 5, и Mix 6, STD (BSA, Lc, Lg, La) и BSA. Електрофорезата е проведена при постоянна сила на тока 30 mA и начално напрежение 105 V с продължителност на процеса 3,20 часа. Гелът е оцветен с разтвор на Coomassie brilliant blue G – 250 за 30 минути, след което е промит и обезцветен. Разчитането на гела и изчисленията на молекулните маси е извършено с помоща на софтуер *GelAnalyzer-19.*

4.3.8. Количествено определяне съдържанието на *Adenosine* и *Cordycepine* в суровина от гъбен мицел и плодно тяло чрез HPLC.

HPLC анализът за количествено определяне на *Adenosine* и *Cordycepine* е извършен чрез апарат *HP Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, DAD* [λ=260 nm], Agilent Poroshell 120 HPH-C18, [4.6 x 100 mm, 2,7 μm], режим на елуиране изократен режим с скорост на елуента 0,7 ml/min, Run [15 min] и течна фаза със състав: (A) H_2O: MeOH [92:8], (B) H_2O: MeOH [85:15], A: B (98:2).

Отделени аликвоти от екстрактите са разредени с $MeOH_{(50\%)}$ с концентрация 100 mg/ml. Пробите са обработени с ултразвукува вана до пълното им разтваряне и преди инжектиране са филтрувани с картридж филтър с големина на порите 220 nm.

Използвани са референтни стандарти от *Adenosine* и *Cordycepine*, закупени от Sigma Aldrich. Подготвен е стандарен разтвор, съдържащ смес от двата стандарта с концентрация 100 μg/ml, използван за направата на калибрационна крива. Калибриращите разтвори са разредени с $MeOH_{(50\%)}$ в диапазона на линейност, съответно с концентрации 25 μg/ml, 50 μg/ml и 100 μg/ml.

4.3.9. Количествено определяне на белтъчното съдържание в екстракти от култивирани медицински гъби - по метод на Келдал чрез определяне на общ азот.

Метода се основава на колечественото определяне на азота получен от отделения амоняк получен като продукт на сернокиселата реакция на минерализация при изгаряне на белтъчната проба.

Принцип на метода. При загряване до 400^0 С, с концентрирана сярна киселина, органичните съединения се окисляват до въглероден диоксид (CO_2) и вода (H_2O), а азотът (N_2) без диазовия (-N=N-) се освобождава под формата на амоняк (NH_3) и се свързва със сярната киселина (H_2SO_4), превръщайки се в сулфат [$(NH_4)_2SO_4$] по реакцията:

$$2NH_3+H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

За ускоряване на процеса се използват катализатори като медни и живачни соли, селенова смес, водороден пероксид и др.

За освобождаване на образувалият се амоняк от сулфата се използва 35% разтвор на натриева основа (NaOH) по реакцията:

$$(NH_4)_2SO_4+NaOH \longrightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$$

Разтвора необходим за титруване се получава чрез смесване на дистилата с предварително приготвен 4% разтвор на борна киселина (H_3BO_3).

Отделеното количество амоняк се определя чрез титруване с 0,1N разтвор на сярна киселина (H_2SO_4) и индикаторна смес представляваща алкохолен разтвор на метилрот и метиленово синьо, водещи до промяна в цвета на реакционната смес от зелено (при алкална среда) до виолетово (при кисела среда).

4.3.10. Остатъчно влагосъдържание на екстрактите след лиофилизация (%) - влагомерна везна с инфрачервено загряване „Sartorius“.

За провеждане на измерването се използва метод за изсушаване чрез нагряване, като за тази цел 1g измерено количество (с точност до 4-ти знак след запетаята) от пробата се нанася на тънък слой върху плота на апарата „Sartorius“. Стартира се процедурата за изсушаване след което се измерва останалото количество сух остатък. Резултата се представя в %, като се изчислява по формулата:

%, (влага на пробата) = **М**(изходна проба) -**М** (сух остатък) / **М**(изходна проба) х 100

Съответно за изчисление на % (сух остатък) се използва следната формула:

%, (сух остатък) = **М** (сух остатък) / **М** (изходна проба) х 100

Където:

- **%**, (влага на пробата) – процентно съдържание на влага в изходната проба
- **%**(сух остатък) – процентно съдържание на общото количество на сухия остатък в изходната проба
- **M**(изходна проба) – маса на изходната проба, g (с точност ±0,0001g)
- **M** (сух остатък) – маса на сухия остатък след изсушаване на пробата, g (с точност ±0,0001g)

4.3.11. Микробиологични изследвания на лиофилизираните екстракти : (БДС 1670-82).

- Общ брой мезофилни аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми – CFU/g (БДС EN ISO 4833-2013);
- *Escherichia coli* в 0,1 g от продукта (ISO 16649 - 1,2,3);
- Патогенни микроорганизми, в т.ч. *Salmonella* (БДС EN ISO 6579:2003) в 25,0 g от продукта;
- Коагулазоположителни стафилококи в 1,0 g от продукта (БДС EN ISO 6888-1-2005);
- Сулфитредуциращи клостридии в 0,1 g от продукта (ISO 15213-2003);
- Спори на микроскопични плесени и дрожди, CFU/g (БДС ISO 6611-2006);

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Разработен е технологичен модел за създаване на биологично активен продукт на основата на органични източници. Като изходна суровина за производството на функционалния продукт са използвани екстракти, получени в резултат на култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps Militaris* и бактериалния щам продуцент *Bacilus subtilis.*

5.1. Култивиране на клетъчна култура на висши медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* в течна среда.

5.1.1. Размножаване на стартерните култури *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps Militaris* за получване на изходен инокулум.

Първият етап от култивирането обхваща размножаване на стартерните култури в стандартна среда, препоръчана от производителя. Размножаването на гъбите *Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps Militaris* е проведено чрез инокулиране на хранителната среда със стартерна клетъчна култура (Фиг. 14), докато за *Ganoderma lucidum* е използван промишлено отгледан жив мицел. (Фиг. 15).



Фигура 14. Инокулирана течна среда с течна клетъчна култура *Ganoderma, neo-japonicum Cordyceps sinensis* и *Cordyceps Militaris*



Фигура 15. Инокулирана течна среда с мицел на *Ganoderma lucidum*

Проследено е размножаването на клетъчните култури в стартовата хранителна среда, предложена от производителя и течната хранителна среда М0. Визуално е установено, че и при четирите клетъчни култури е налице по-интензивен процес на нарастване в среда М0 (фиг.16). Така размножените клетъчни култури са използвани за следващо инокулиране.



Фигура 16. Развитие на клетъчни култури ***Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis*** в стандартна и М0 среди

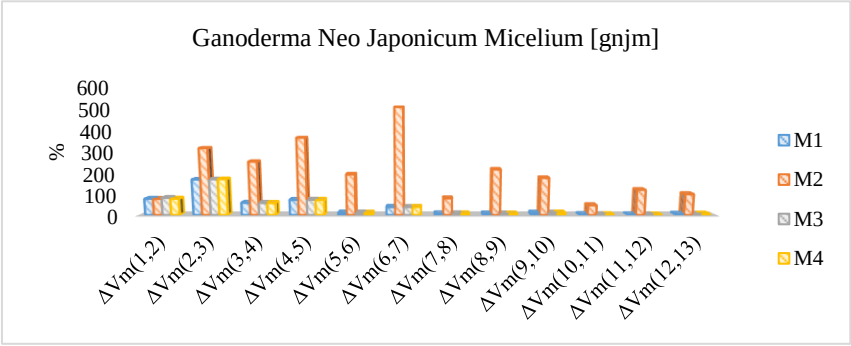
5.1.2. Култивиране на свеж мицел от медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* в течна хранителна среда (I фаза).

Свежият мицел се счита за развит при формиране на сферични форми от мицелната култура. Наблюдението на развитието на четирите медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* показва формиране на сфери с различна големина (фигура 17)

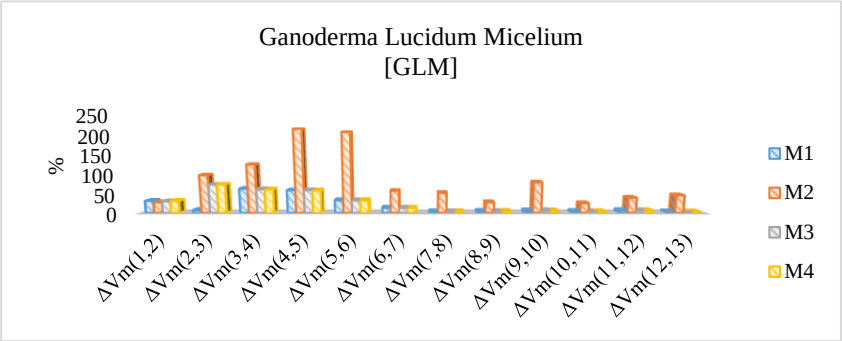


Фигура17. Развити свежи мицелни култура в течна хранителна среда
(a) Ganoderma neo-japonicum, (б) *Ganoderma lucidum*, (c) *Cordyceps sinensis* (d) *Cordyceps millitaris*

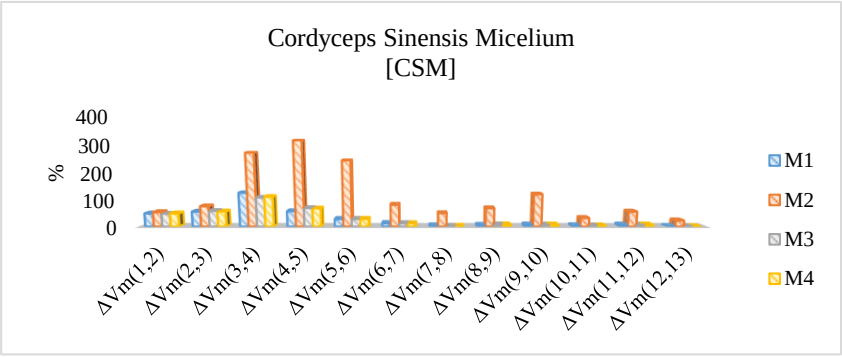
При развитието на мицела чрез размножаване на гъбната клетъчна култура се образуват свързани клетъчни структури във вид на хифи, представляващи канали за пренос на хранителни вещества и вода за изхранване. По този начин част от разтвора от хранителната среда преминава в хифите. Чрез измерване обема на неусвоената хранителна среда се определя степента на нарастване на мицела (фиг. 18- 21)



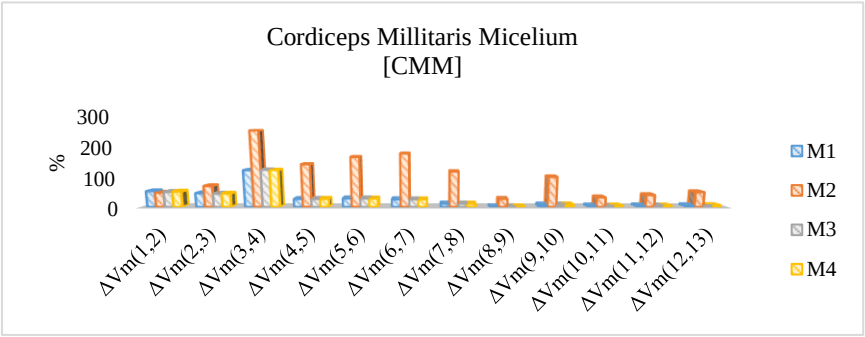
Фигура 18. Нарастване на мицела на ***Ganoderma neo-japonicum*** *(%)*
ΔV_m – степен на нарастване на мицела
среда М1- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O
среда М2 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4 ,K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.
среда М3 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $FeSO_4$.
среда М4- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.



Фигура 19. Нарастване на мицела на *Ganoderma lucidum (%)*
ΔV_m – степен на нарастване на мицела
среда М1- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O
среда М2 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4 ,K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.
среда М3 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $FeSO_4$.
среда М4- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.



Фигура 20. Нарастване на мицела на *Cordyceps millitaris (%)*
ΔV_m – степен на нарастване на мицела
среда М1- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O
среда М2 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4 ,K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.
среда М3 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $FeSO_4$.
среда М4- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.



Фигура 21. Нарастване на мицела *Cordyceps sinensis (%)*
ΔV_m – степен на нарастване на мицела
среда М1- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O
среда М2 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт,глюкоза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4 ,K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.
среда М3 - картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $FeSO_4$.
среда М4- картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, декстроза, FOS, $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4 ,$FeSO_4$.

Експериментално е установено, че най-добро нарастване на мицела има в хранителна среда М2, последвана от хранителна среда М4 и М3, М1, а най-нисък растеж се наблюдава в контролната среда М0.

От направената оценка, хранителната среда М2 е избрана за последващо култивиране на мицел от избраните висши гъби. Получената мицелна култура ще бъде подложена на ферментация с жива клетъчна култура *Bacilus subtilis* за получаване на биологично активен екстракт и производство на функционален продукт.

5.1.3. Култивирането на мицел от медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris* върху твърда хранителна среда (етап II).

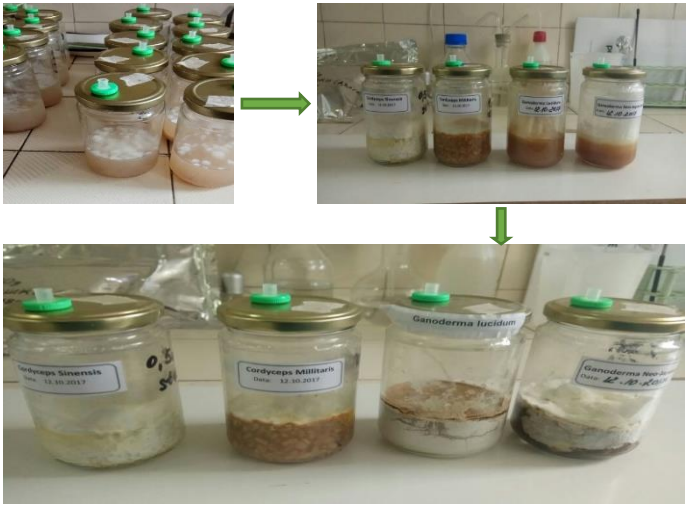
Изследвани са лабораторни модели за култивиране на висшите гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris* в твърди хранителни среди.

Процедурата по обработка на твърдите среди за култивиране е представена на Фигура 22.



Фигура 22. Обработка на твърди хранителни среди.

След стартиране на култивирането, пробите от термо шкафа са оставени без източник на светлина за 168 часа, след което е спазен фотопериод 12 часа с естествена светлина и 12 часа без светлина при 28℃. При проследяване на нарастването е установено повърхностно развитие на мицелната култура между 7-ми и 20-ти ден (Фигура 23).



Фигура 23. Проследяване нарастването на мицела на *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris*.

Проведена е визуална оценка на нарастването на мицела на висшите гъби при дълбочинното култивиране, като се наблюдава през интервали от 15 дни.

Дълбочинно развитие на мицелната култура се наблюдава между 30-ти и 90-ти ден, като най-добър резултат за всички висши гъби се отчита при хранителна среда S2 (с добавен въглероден източник ориз).

5.2. Полупромишлен метод за култивиране на клетъчна култура от *Cordyceps millitaris* за получаване на плодно тяло и високо съдържание на *Cordycepin*.

Изследването е проведено във ферма за отглеждане на медицински гъби с предприятие за производство на екстракти, намиращо се в град Джинхуа, Китай.

Приготвени са общо 5000 L работна среда, съответно 2500 L от среда IM1 и 2500 L от среда IM2. Така получени работните среди са разляти в 12500 буркана от 750 ml, запълнени до обем 200 ml за среда IM1 и 12500 буркана за среда IM2. След стерилизания, хранителните среди са инокулирани с течна клетъчна култура от *Cordyceps millitaris* – щам продуцент *Shanghai.*

Култивирането е проведено за 67 дни, като през първите 7 дни е стартирано при липса на осветление, след което е продължено при планирания фотопериод 16 часа светло към 8 часа тъмно за още 60 дни.

На Фигура 24 е представено култивиране на плодно тяло от *Cordyceps millitaris – Shanghai.*



Фигура 24. Култивиране на плодно тяло от *Cordyceps millitaris – Shanghai.*

При проведения експеримент са получени общо 4 вида изходни суровини за екстракти за влагане в крайни дозови форми (Таблица-12).

Таблица 12. Получени суровини от полупромишлено култивиране на *Cordyceps sinensis – Shanghai*

Хранител на среда	Изходно количество, L	Инокулирани буркани, бр	Мицелна култура, kg	Плодно тяло, kg	Мицелна култура в буркан, g	Плодно тяло в буркан, g
IM1	500	2500	462,5 ±33,76	175 ±12,78	185 ±13,5	70 ±5,1
IM2	500	2500	475 ±38,95	275 ±22,55	190 ±15,58	110 ±9

Хранителна среда IM1 - картофени обелки, обелки от захарна тръстика, соев пептон, дрождев екстракт, глюкоза, пълнозърнест ориз, Азомит , $MgSO_4$ x 7 H_2O, Витамин B_1,
Хранителна среда IM2 - картофени обелки, обелки от захарна тръстика, соев пептон, дрождев екстракт, глюкоза, пълнозърнест ориз, прах от черупки от скариди, мононатриев глутамат, L-глицин, $(NH4)_2SO_4$, Азомит $MgSO_4$ x 7 H_2O Витамин B_1, KH_2PO_4, K_2HPO_4, FeSO4 · 7H2O

Анализът на получените данни показва, че при среда IM1 полученото количество гъбно тяло представлява 35% спрямо изходната суровина, мицелната култура представлява 92,5% спрямо изходната суровина, а общото количество суровина за производство на екстракти представлява 127,5% спрямо изходната суровина.

При среда IM2 полученото количество гъбно тяло представлява 55% спрямо изходната суровина, мицелната култура представлява 96% спрямо изходната суровина, а общото количество суровина за производство на екстракти представлява 151% спрямо изходната суровина.

Този резултат показва, че при тези условия на култивиране общото количество субстрати в системата в среда IM1 се увеличава с 27,5%, а в среда IM2 - 51%, което вероятно се дължи на усвоения от въздуха азот, въглероден диоксид и вода.

Общото количество суровини получени от провеждане на експеримента е 937,5 kg свежа мицелна култура и 450 kg свежо плодно тяло. Суровините са подложени на екстракция чрез ферментация и лиофилизирани.

5.3. Размножаване на клетъчна култура от щам *Bacillus subtilis*

5.3.1. Увеличаване броя на жизнеспособните клетки чрез оптимизиране състава на хранителната среда

Използван е рехидратиран лиофилизиран щам продуцент *Bacilus subtilis NBIMCC 2353*, който първоначално е намножен в стандартна хранителна среда, а получения културален разтвор е използван за последваща инокулация. Чрез добавяне на пребиотични и други вещества, имащи отношение към стимулиране размножаването на клетките, от инокулума е получена **контролна среда (К**). Към нея са добавени прахообразни екстракти от два вида висши гъби *Cordyceps sinensis* и *Ganoderma lucidum* в две различни концентрации: 1 g/l и 2 g/l и са получен **среди С1-С4**. Във всички варианти инокулумът от щам продуцента е с начална концентрация на клетките $1,6x10^7$ CFU/ml.

Определянето на плътността на клетъчната култура и изчисляване на броя на клетките на щама в различни хранителни среди е направено спектрофотометрично, според стандарта на *McFARLAND*.

Таблица 13. Брой клетки *Bacillus subtilis NBIMCC 2353* (log N) в изследваните среди, отчетен в началото на култивирането, на 24-ия, 48-мия и 72-рия час след началото на култивиране (n=3)

Хранителна среда	Брой клетки (log N), отчетени в началото на култивирането	Брой клетки (log N), отчетени на 24-тия час	Брой клетки (log N), отчетени на 48-мия час	Брой клетки (log N), отчетени на 72-рия час
(К)	7,2 ± 0,009	8,75 ± 0,008	9,07 ± 0,007	8,14 ± 0,006
С1	7,2 ± 0,006	9,79 ± 0,007	10,28 ± 0,008	9,30 ± 0,006
С2	7,2 ± 0,007	9,83 ± 0,008	11,58 ± 0,008	11 ± 0,007
С3	7,2 ± 0,005	9,75 ± 0,005	10,26 ± 0,003	9,60 ± 0,006
С4	7,2 ± 0,008	9,88 ± 0,006	11,65 ± 0,007	11,50 ± 0,003

Хранителна среда **К** – екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, Хранителна среда **С1** - екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, ***Cordyceps sinensis ext.,***Хранителна среда **С2** - екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, ***Cordyceps sinensis ext.,***Хранителна среда **С3** - екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, ***Ganoderma lucidum ext.,***Хранителна среда **С4** - екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, ***Ganoderma lucidum ext.***

В контролната среда (К), където клетъчната култура се размножава без добавени обогатители, броят на клетките се увеличава до 1,87 log единици и пикът на нарастване е към 40 - 48-ия час след инокулирането. След този период, започва отмиране на клетъчната култура и към 72-рия час се наблюдава намаляване на клетките с почти цяла log единица. В среди С1 и С3 с добавени по 1g екстракт от *Cordyceps sinensis* и *Ganoderma lucidum* се наблюдава определено сходство в размножителния времеви диапазон на културата. Пикът на размножаване е също към 48-ия час от началото на опита и нарастването е с малко над 3 log единици (10,28 log N за среда С1 и 10,26 log N за среда С3). Към 72-ия час се наблюдава спад в среда С1 с 1 log единица до 9,30 log N, а във среда С3 с добавен екстракт от *Ganoderma lucidum* (1 g) клетките намаляват с 0,66 до 9,60 log N. При среди С2 и С4 с добавени 2 g екстракт от двете висши гъби се установява по-голям брой клетки, почти 4,5 log единици. Най-висок брой е отчетен за среда С4 – 11,65 log N (към 48-ия час). Отмирането на клетките след пика на размножаването им до 72-рия час също е белязано с по-малък брой (около 0,5 log единици), съответно при среда С2 – до 1до :1000og N, а при С4 – до 11,50 log единици, при която до 72-рия час отмират много малък брой клетки и броя на живите клетки остава почти същия като този, регистриран на 48-ия час.

Установено е, че във всички среди - контролна (К) и С1-С4 пикът на нарастване на клетъчната популация се достига към 48-ия час. В хранителните среди с добавени екстракти на двете медицински гъби са отчетени по-високи максимални количества клетки, отколкото в контролния вариант. От тях най-голям брой има във вариантните проби с внесени 2 g екстракти, където до 48-ия час броят на клетките нараства с почти 4,5 log единици, а към 72-рия час се отмират малко количество клетки. Това е особено ясно за хранителната среда с добавен 2 g екстракт от *Ganoderma lucidum*.

При внасянето на прахообразните екстракти на *Cordyceps sinensis* и *Ganoderma lucidum* в хранителната среда за култивиране на щам *Bacillus*

subtilis NBIMCC 2353 се наблюдава увеличаване броя на клетките, което доказва положителното им въздействие върху ръста на популацията.

5.3.2. Увеличаване на общата протеолитична активност на хранителна среда за култивиране на *Bacillus Subtilis,* обогатена с нативен говежди колагенов белтък и мицел от висши медицински гъби

Получените експериментални данни са представени в таблица 14.

Таблица 14. Протеолитична активност на *Bacillus Subtilis в среда* с добавен нативен говежди колагенов белтък и мицел от висши медицински гъби.

Среда	PU/ml, 24 h.	PU/ml, 48 h.	PU/ml, 72 h.
K	1,38 ± 0,004	2,27 ± 0,006	1,89 ± 0,003
P1	15,74 ± 0,006	23,74 ± 0,007	19,71 ± 0,005
P2	17,37 ± 0,004	26,83 ± 0,008	22,18 ± 0,007
P3	18,34 ± 0,007	30,57 ± 0,006	25,47 ± 0,008
P4	14,91 ± 0,003	24,42 ± 0,007	20,56 ± 0,005
P5	13,67 ± 0,005	21,51 ± 0,007	17,85 ± 0,004

K-Контрола - екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, **P1**- среда с добавен нативен говежди колаген, **P2**-среда с добавен мицел от *Ganoderma neo-japonicum*, **P3**- среда с добавен мицел от *Ganoderma lucidum*, **P4**- среда с добавен мицел от *Cordyceps sinensis* и **P5**- среда с добавен мицел от *Cordyceps millitaris*

Установената обща протеолиична ензимна активност е най-висока при 48 час след инокулиране. Констатирана е по-висока протеолитична активност при добавяне на белтъчни източници спрямо контролата. Във вариантите с добавен гъбен субстрат е констатирана по-висока протеолитична активност спрямо варианта с добавен колаген, което вероятно се дължи на по-богатия състав на гъбния мицел спрямо колагена. Това дава основание за използване на този подход при разработване технологията на новия продукт.

5.3.3. Увеличаване на хитиназната ензимна активност на хранителна среда за култивиране на *Bacillus Subtilis* при добавяне на нехидролизирани фрагменти от жив мицел на четири вида медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris* и хитин от черупки на скариди

В Таблица 15 са представени резултатите от изследване на хитиназната активнност на хранителна среда за култивиране на *Bacillus Subtilis.* Наблюдава се тенденция към увеличаване ензимна активност при добавяне на компоненти съдържащи хитин от скариди (CH1) и свеж мицел от *Ganoderma lucidum* (CH2), *Ganoderma Heo-Japonicumm* (CH3), *Cordyceps sinensis* (CH4) и *Cordyceps millitaris* (CH5)

Таблица 15. Хитиназна ензимна активност на *Bacillus Subtilis*

Хранителна среда	Хитиназна активност (U/mL), отчетена на 24-тия час	Хитиназна активност (U/mL), отчетена на 48-мия час	Хитиназна активност (U/mL), отчетена на 72-рия час
(К)	4,37 ±0,002	8,65 ±0,001	6,83 ±0,006
СН1	32,57 ±0,007	40,86 ±0,006	37,68 ±0,007
СН2	33,78 ±0,007	41,62 ±0,003	38,43 ±0,002
СН3	34,46 ±0,007	42,73 ±0,003	39,58 ±0,002
СН4	31,64 ±0,007	39,93 ±0,003	36,82 ±0,006
СН5	33,47 ±0,007	41,29 ±0,003	38,62 ±0,004

Контролна **среда (К)** екстракт от месо, пептон, дрождев екстракт, FOS, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$; **СН1-**среда с добавен хитин от скариди; **СН2-**среда с добавен свеж мицел от *Ganoderma lucidum;* **СН3-** среда с добавен свеж мицел *от Ganoderma Heo-Japonicumm,* **СН4-**среда с добавен свеж мицел от *Cordyceps sinensis;* **СН3-** среда с добавен свеж мицел от *Cordyceps millitaris*

Отчетената хитиназна ензимна активност на средите с добавен свеж мицел от гъби е по-висока спрямо варианта с добавен хитин от скариди и контролната среда. Получените резултати доказват, че *Bacilus Subtillis* е подходящ щам продуцент за използване в биотехнологичен процес за ензимно смилане на гъбен субстрат от свеж мицел и успешно може да се приложи в производството на разработвания функционален продукт. Предвид най-високо отчетения резултат на 48-я час, в технологията за производство може да се заложи двудневен цикъл на обработка.

5.4. Получаване на биологично активни екстракти от мицелни култури чрез ферментация с живи клетки на *Bacilus subtilis* и използване на ензими.

За освобождаване на биологично активните вещества от клетката и клетъчната стена, без да е необходимо използване на органични разтворители, е приложен ензимен метод за разграждане структурите на клетката, който протича в температурен диапазон 18-20°C при разтворител вода. Необходимата киселинност на разтвора е постигната чрез лимонена киселина и условията на обработка запазват непроменени биологично активните вещества, така както протичат естествено процесите в природните системи. Отстраняването на разтворителя при този подход се извършва в условия на вакуум и ниска температура чрез процес на лиофилизация, при който е гарантирано запазване на летливите и термолабилните молекули.

Като изходна суровина е използван жив мицел от *Ganoderma lucidum,* който съдържа над 400 вида биологично активна вещества. За разграждането на клетъчната стена са използвани ензимите: DeniLight (лаказа), Lipopan (липаза), Fungamyl 4000 SG (алфа амилаза), Celluclast 1,5 L (целулаза), Chitinase в количества по 0,5 g всеки. Суровината от живия мицел от *G. Lucidum* е отгледана за период от шест месеца в лабораторни условия в ИКХТ-София.

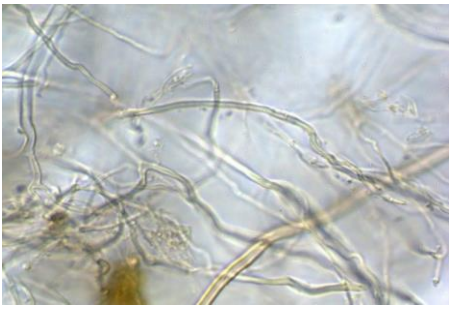
Проведени са микроскопско и хроматографско изследване за установяване разграждането на клетъчната стена. За микроскопско наблюдение е взета проба от разтвора преди началото на процеса на ензимна хидролиза и проба от получения комплексен екстракт в края на процеса. Проведена е ферментация с живи клетки на щам продуцента *Bacilus subtilis* и от получената културална

течност е сепарирана лека и тежка фракция.

Хроматографският анализ е направен на проба, отделена от получената супернатанта на комплексния екстракт.

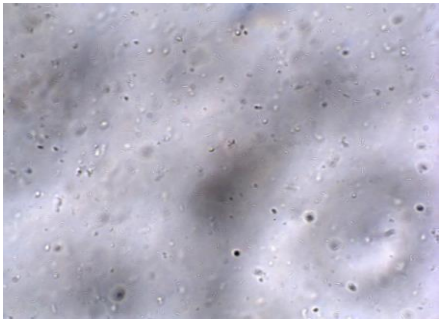
На Фигура 25 е представено микроскопско изображение на изходната суровина след етапа на първоначалното механично микронизиране. Ясно се виждат клетъчни структури във вид на влакнести хифи от гъбната материя. От микроскопското наблюдение става ясно, че клетките в началния етап след микронизиране са в своята цялост без разрушени клетъчни стени.

Фигура 26 представя микроскопско изображение на получения комплексен екстракт в крайния етап след ензимното хидролизиране на клетъчната стена.



Фигура 25. Зрително поле от микроскопско наблюдение на жив мицел от *Ganoderma lucidum* след етапа на механично микронизиране.

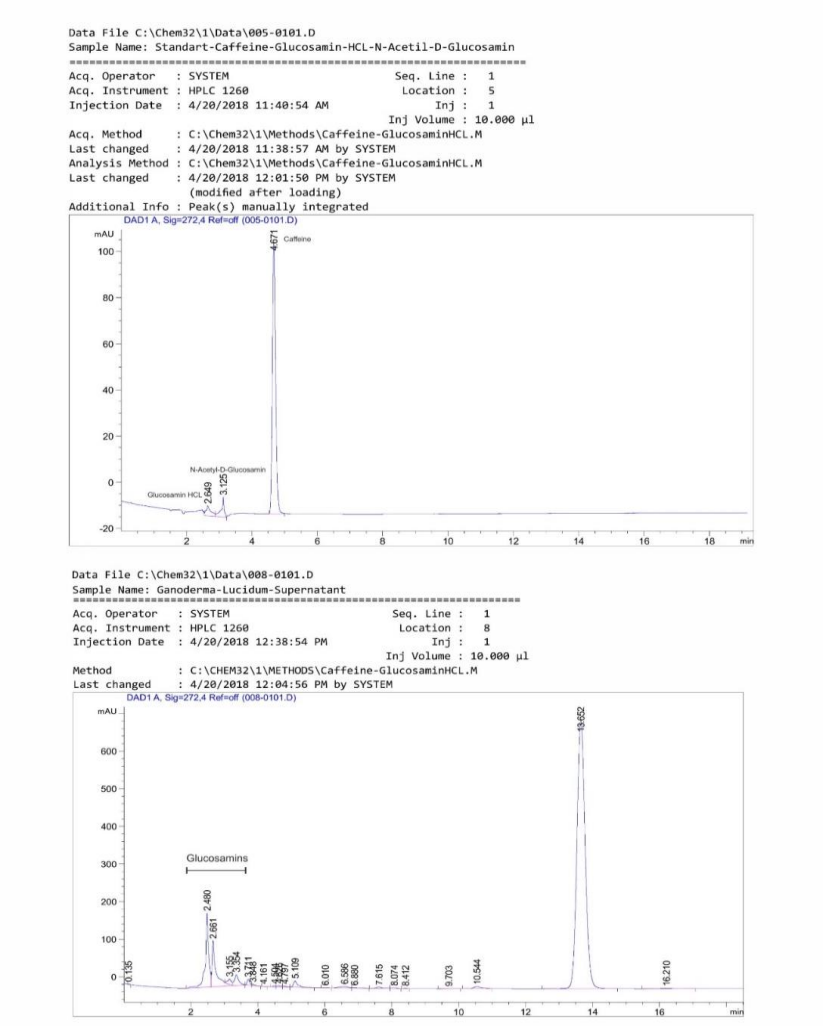
Ясно личи отсъствието на цели структури от клетки с неразградена клетъчна стена. Това показва, че клетъчните стени са разградени и вътреклетъчните вещества са преминали в разтвора, като по този начин се е получил биологично активен екстракт със запазени биологично активни вещества.



Фигура 26. Зрително поле от микроскопско наблюдение на препарат от комплексен екстракт в крайния етап след ензимното разграждане на клетъчната стена.

На Фигура 27 са представени хроматограмите на пробите - стандарт и супернатанта след сепариране на комплексния екстракт. На първата

хроматограма се отчитат пиковете на стандартите Glucosamin HCL и N-Acetil-D-Glucosamin. На хроматограмата от супернатантата от екстракта се отчитат отново пикове за фракции на Glucosamin в областта на времената на стандартите, което е допълнително доказателство за разграждане на хитиновия слой от клетъчната стена. Хроматографското изследване е проведено с оглед качествено определяне без количественни изчисления, които не са обект на настоящия проект. Целта на това изследване е единствено доказване разграждането на хитиновия слой на гъбните клетки.



Фиг. 27. Хроматограми от проведено изследване с HPLC, Agilent 1260 на отделена проба от супернатанта след сепариране на ензимно третиран екстракт от мицел и плодно тяло на *G. Lucidum*

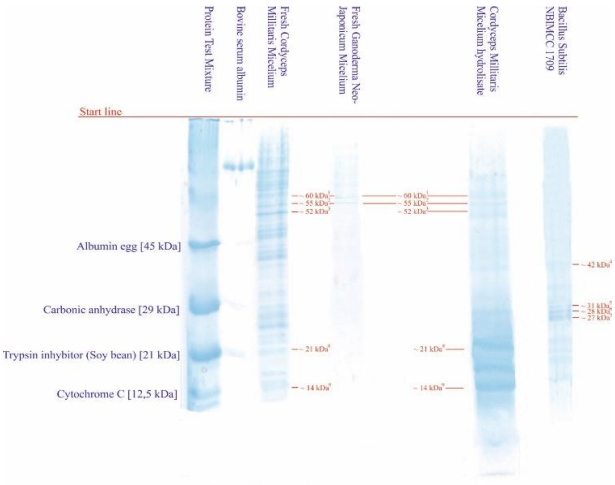
Резултатите доказват, че при използване на този метод се постига получаване на екстракти при които са запазени всички активни вещества, поради протичане на процесите при температури щадящи биологичната активност на термолабилните съединения. Методът може да бъде регулиран в зависимост от необходимоста за максимално запазване на целеви биологично активни вещества чрез промяна на етапите с включена ензимна реакция, както и използването на различни ензими в зависимост от обработваната растителна матрица на използваната суровина.

5.5. Експериментало доказване наличието на биологично активни компоненти в екстракти от мицел на *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps millitaris*

5.5.1. Установяване наличието на протеини с различна молекулна маса

Проведено е биохимично изследване върху белтъчния спектър на опитни образци от медицински гъби и културална проба от *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 съгласно метода на Laemmli (1970).

На фигура 28 е представен резултата от проведена електрофореза в полиакриламиден гел на медицински гъби и проба от *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353.



Фигура 28. SDS – PAGE на медицински гъби и културална проба от *Bacillus subtilis*
1-мицел от *Cordyceps militaris*; 2 – културална течност от *Cordyceps militaris*; 3 – мицел от *Ganoderma neo-japonicum*; 4 – културална течност от *Ganoderma neo-japonicum*; 5 – стар мицел от *Ganoderma lucidum*; 6 – стар мицел от *Cordyceps sinensis*; 7 – лиофилизат от *Cordyceps militaris*; *8 - Bacillus subtilis* NBIMCC 2353; PTM – смес протеини с известна молекулна маса; BSA – говежди серумен албумин

Чрез дензитометричен анализ е определена електрофоретичната подвижност на белтъчните фракции на изследваните опитни варианти. Резултатите са посочени в таблица 16.

Таблица 16. Електрофоретична подвижност на белтъчните фракции на проби от медицински гъби и културална проба от *Bacillus subtilis* NBIMCC 235

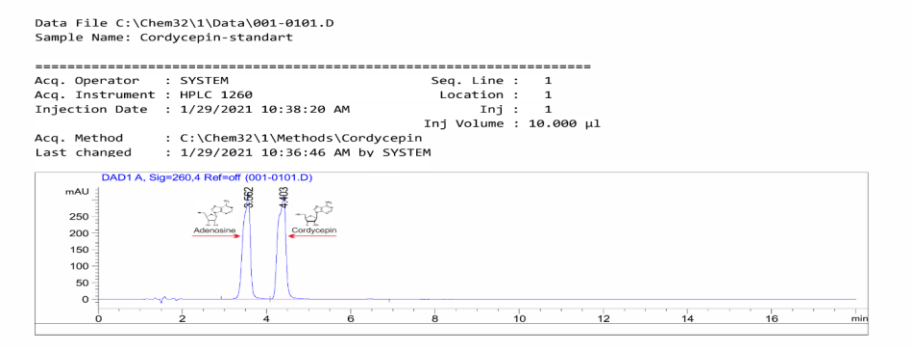
Проба	Ивица/ Лента	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW (молекулна маса)
1. Protein Test Mixture	1.	0,407	2027	-	45000
1. Protein Test Mixture	2.	0,612	2550	-	29000
1. Protein Test Mixture	3.	0,763	2697	-	21000
1. Protein Test Mixture	4.	0,883	1620	-	12500
1. Protein Test Mixture	5.	0,918	470	-	6500
2. Bovine serum albumin	1.	0,158	967	-	62582
3.Свеж мицел *CMM*	1.	0,064	132	-	69265
3.Свеж мицел *CMM*	2.	0,082	234	-	67941
3.Свеж мицел *CMM*	3.	0,103	343	-	66491
3.Свеж мицел *CMM*	4.	0,136	523	-	64095
3.Свеж мицел *CMM*	5.	0,183	400	-	60754
3.Свеж мицел *CMM*	6.	0,21	589	-	58863
3.Свеж мицел *CMM*	7.	0,243	701	-	56530
3.Свеж мицел *CMM*	8.	0,275	630	-	54198
3.Свеж мицел *CMM*	9.	0,301	660	-	52370
3.Свеж мицел *CMM*	10.	0,354	451	-	48587
3.Свеж мицел *CMM*	11.	0,37	692	-	47453
3.Свеж мицел *CMM*	12.	0,441	684	-	42410
3.Свеж мицел *CMM*	13.	0,553	273	-	34467
3.Свеж мицел *CMM*	14.	0,598	397	-	31252
3.Свеж мицел *CMM*	15.	0,629	639	-	29045
3.Свеж мицел *CMM*	16.	0,66	739	-	26839
3.Свеж мицел *CMM*	17.	0,691	317	-	24632
3.Свеж мицел *CMM*	18.	0,741	371	-	21039
3.Свеж мицел *CMM*	19.	0,812	299	-	15996
3.Свеж мицел *CMM*	20.	0,841	215	-	13979
3. Свеж мицел *CMM*	21.	0,852	156	-	13159
4. Свеж мицел *GNJ*	1.	0,19	94	-	60315
4. Свеж мицел *GNJ*	2.	0,267	128	-	54783
5. Лиофилизат *CMM*	1.	0,148	490	-	63303
5. Лиофилизат *CMM*	2.	0,204	495	-	59302
5. Лиофилизат *CMM*	3.	0,226	300	-	57747
5. Лиофилизат *CMM*	4.	0,258	345	-	55469
5. Лиофилизат *CMM*	5.	0,301	340	-	52413
5. Лиофилизат *CMM.*	6.	0,407	385	-	44857
5. Лиофилизат *CMM*	7.	0,534	829	-	35801
5. Лиофилизат *CMM*	8.	0,625	1173	-	29356
5. Лиофилизат *CMM*	9.	0,689	1111	-	24800
5. Лиофилизат *CMM*	10.	0,74	1046	-	21133
5. Лиофилизат *CMM*	11.	0,774	728	-	18688
5. Лиофилизат *CMM*	12.	0,84	354	-	14021
5. Лиофилизат *CMM*	13.	0,888	508	-	10632
5. Лиофилизат *CMM*	14.	0,985	135	-	3687
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	1.	0,4	399	-	45369
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	2.	0,446	196	-	42064
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	3.	0,507	315	-	37733
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	4.	0,537	401	-	35568
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	5.	0,596	132	-	31408
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	6.	0,643	106	-	28046
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	7.	0,655	219	-	27191
6. *Bacillus subtilis* NBIMCC2353	8.	0,73	271	-	21835

Анализът на белтъчния спектър на културална течност отчита наличието на протеинови фракции с молекулни маси в диапазона от 3,7 до 100 kDa. Според Kim et al., 2006; Choi & Sa, 2000; Lee et al., 2005; Lee et al., 2007 и др. автори в този диапазон са и молекулните маси на фибринолитичните ензими Nattokinase (Subtilisin NAT 27,7 kDa), Streptokinase (47 kDa), Urokinase (34 kDa), Metaloprotease from Armilaria mellea (18,5 kDa). Наличието на фракции с молекулна маса максимално близка до молекулните маси на фибринолитичните ензими показва наличие на потенциал за разработване на технология за производство на биологично активен продукт с използване на изследвания екстракт.

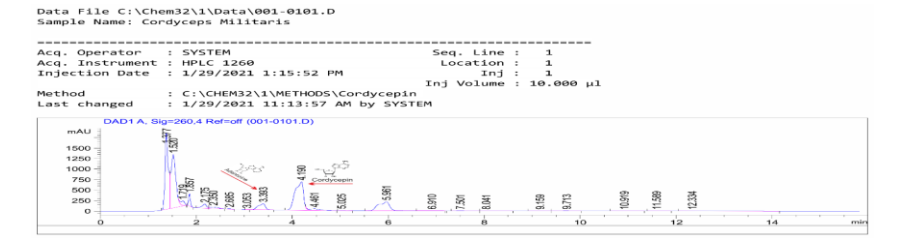
5.5.2. Установяване съдържанието на кордицепин и производни на аденозин

Направена е сравнителна оценка на съдържанието на кордицепин и производни на аденозин в екстракти, получени от лабораторно отгледан свеж мицел спрямо промишлено култивиран мицел на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris*. За култивирането на *Cordyceps millitaris* са приложени два технологични метода – промишлен и оптимизиран.

За установяване съдържанието на кордицепин и производни на аденозин е проведен HPLC анализ. Резултатите от изследването са представени на фигури 29, 30, 31 и в таблица 17.



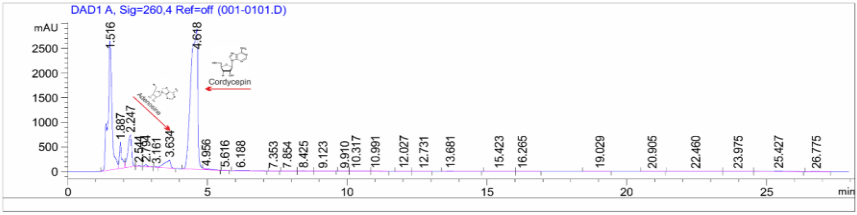
Фиг. 29. Хроматограма от проведено изследване с HPLC на стандарти *Adenosin* и *Cordicepin*



Фиг. 30. Хроматограма от проведено изследване с HPLC на екстракт от *Cordyceps millitaris*, промишлено култивиран по стандартен метод

```
Data File C:\Chem32\1\Data\001-0101.D
Sample Name: Cordyceps Militaris Sample-optimisation

======================================================================
Acq. Operator   : SYSTEM                      Seq. Line :   1
Acq. Instrument : HPLC 1260                   Location :   1
Injection Date  : 1/29/2021 12:38:44 PM           Inj :   1
                                            Inj Volume : 10.000 µl
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\Cordycepin
Last changed    : 1/29/2021 11:13:57 AM by SYSTEM
```



Фиг. 31. Хроматограма от проведено изследване с HPLC, на екстракт от *Cordyceps millitaris*, промишлено култивиран по оптимизиран метод

Таблица 17. Съдържание на кордицепин и производни на аденозин в екстракти, получени от лабораторно (свеж мицел) и промишлено култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris*.

	GLM Промишлен	CSM Промишлен	CMM Промишлен	CMM Оптимизиран Промишлен	CM Fresh	CS Fresh	GL Fresh	GNJ Fresh
Adenosins Dry%	0,3	0,59	0,4	0,64	0,09	0,12	0,1	0,05
Adenosins Dry c[mg/g]	29,94	59,14	40,35	64,22	8,46	12,16	10,54	4,52
Cordycepins Dry%	0,09	0,28	0,32	2,22	0,08	0,05	0,1	0,11
Cordycepins Dry c[mg/g]	9,01	28,3	32,25	221,69	7,83	4,88	9,72	10,79

GLM (Промишлен) – *Ganoderma lucidum Micelium* промишлено отглеждан, CSM – *Cordyceps sinensis Micelium* промишлено отглеждан, CMM (Промишлен) – *Cordyceps millitaris Micelium* промишлено отглеждан, CMM (Оптимизиран Промишлен)- промишлено отглеждан по оптимизиран метод; CMFresh – свеж мицел от *Cordyceps millitaris*, CSFresh - свеж мицел от *Cordyceps sinensis*, GLFresh - свеж мицел от *Ganoderma lucidum*, GNJFresh - свеж мицел от *Ganoderma neo-japonicum*

Резултатите от хроматографските изследвания показват ясна тенденция на увеличаване съдържанието на *Cordycepin*е и *Adenosin* в пробата от *Cordyceps millitaris*, култивирана в хранителна среда с оптимизиран състав, като наличието на *Cordycepin*е е 2,22%, а на *Adenosin* е 0,64%, докато в пробата от *Cordyceps millitaris*, култивирана в хранителна среда със стандартен състав е съответно за *Cordycepin*е 0,32%, а за *Adenosin* 0,4%. Реализираното повишение е съответно за *Cordycepin*е 1,9% а за *Adenosin* 0,24%.

Този резултат показва, че хранителната среда с оптимизирания състав по отношение увеличаване съдържанието на *Cordycepin*е може успешно да се прилага за лабораторно и промишлено производство в малки и големи обеми.

Допълнително е направено сравнение на данните за съдържание на *Cordycepin*е и *Adenosin* в проби от мицел култивиран в продължение на 9 месеца, спрямо проби от свеж мицел лабораторно отгледан в течна среда за период от 72 часа. Резултатите показват по-ниско съдържание на целевите субстанции в пробите от лабораторно култивиран свеж мицел спрямо пробите от промишлено отгледан мицел за период от 9 месеца. Това е очакван резултат, поради факта, че по време на началната фаза на култивиране през първите 72 часа, в мицелната култура протичат интензивни ензимни реакции водещи до оползотворяване на по-голямо количество на *Adenosin* и съответно по-слаб синтез на производните му каквото вещество е и *Cordycepin*е. Този резултат демонстрира факта, че използването на мицелната култура за продуциране на ензими е най-продуктивна в интервала до 72 час.

5.5.3. Определяне на общо фенолно съдържание

Проведено е спектрофотометрично изследване за определяне на общото фенолно съдържание в екстрактите от гъбен мицел. За референтен стандарт е използвана галова киселина.

Таблица 18. Общо фенолно съдържание (mg/g)

Проба	GAE mg/g	STD ± mg/g	STD%
CMF (Промишлен стандарт)	15,91	0,003	2,12
CMM (Промишлен)	16,20	0.012	8,44
CSM (Промишлен)	5,525	0,003	7,89
GLM (Промишлен)	46,37	0,042	9,43
CMFB (Промишлен оптимизиран)	113,66	0,039	3,44
CMFresh	17,01	0,007	4,72
CSFresh	20,19	0,013	7,03
GLFresh	17,22	0,012	7,89
GNJFresh	22,16	0,017	8,14

CMF (Промишлен стандарт**)** *Cordyceps millitaris* плодна част индустриално отглеждан по стандартен метод, **CMM (**Промишлен **)** – *Cordyceps millitaris Micelium* индустриално отглеждан, **CSM (**Промишлен**)** – *Cordyceps sinensis Micelium* индустриално отглеждан, **GLM (**Промишлен**)** – *Ganoderma lucidum Micelium* индустриално отглеждан, **CMFB (**Промишлен оптимизиран**)** *Cordyceps millitaris* плодна част индустриално отглеждан по оптимизиран метод, **CMFresh** – свеж мицел от *Cordyceps millitaris*, **CSFresh** - свеж мицел от *Cordyceps sinensis,* **GLFresh** - свеж мицел от *Ganoderma lucidum*, **GNJFresh** - свеж мицел от *Ganoderma neo-japonicum*

Резултатите от изследването (таблица 18) показват, че най-високо съдържание на фенолни вещества се отчита в екстракта от плодна част на *Cordyceps millitaris,* култивиран индустриално по оптимизиран метод 113,66 mg/g. Съпоставено с резултата получен от екстракта от плодна част на *Cordyceps millitaris,* отглеждан индустриално по стандартен метод 15,91 mg/g се наблюдава значително увеличение на съдържащите се фенолни вещества с 7,14 пъти, което вероятно се дължи на приложената оптимизация в метода на култивиране.

В пробите от свежи мицели, отделени след процеса на ферментация се отчитат добри стойности за наличие на фенолни вещества, но това би могло да се дължи на неоползотворени напълно субстанции от тази група намиращи се в хранителната среда.

5.5.4. Антиоксидантна активност в екстракти от гъбен мицел

В Таблица 19 е представен резултат от спектрофотометрично изследване за определяне на антиоксидантна активност в екстрактите от гъбен мицел. За изчисление на получените резултати е разработена калибрационна крива с използвано стандартно вещество токоферол неутрализиращо DPPH• радикал. Резултатите са представени като антиоксидантен еквивалентен капацитет на токоферола (TEAC).

Таблица 19. Спектрофотометрично определяне на антиоксидантен капацитет на екстракти от медицински гъби.

Проба	TEAC mg/g	STD ± mg/g	STD%
CMF (Industrial-st)	0,71	0,042	4,71
CMM (Industrial)	0,67	0,003	0,33
CSM (Industrial)	0,50	0,008	1,19
GLM (Industrial)	1,18	0,062	4,77
CMFB (Промишлен оптимизиран)	1,85	0,019	1,02
CMFresh	0,65	0,018	3,24
CSFresh	0,10	0,021	5,70
GLFresh	0,09	0,02	5,47
GNJFresh	0,15	0,005	1,19

CMF (Промишлен стандарт**)** *Cordyceps millitaris* плодна част индустриално отглеждан по стандартен метод, **CMM (**Промишлен**)** – *Cordyceps millitaris Micelium* индустриално отглеждан, **CSM (**Промишлен**)** – *Cordyceps sinensis Micelium* индустриално отглеждан, **GLM (**Промишлен**)** – *Ganoderma lucidum Micelium* индустриално отглеждан, , **CMFB (**Промишлен оптимизиран**)** *Cordyceps millitaris* плодна част индустриално отглеждан по оптимизиран метод, **CMFresh** – свеж мицел от *Cordyceps millitaris*, **CSFresh** - свеж мицел от *Cordyceps sinensis,* **GLFresh** - свеж мицел от *Ganoderma lucidum*, **GNJFresh** - свеж мицел от *Ganoderma neo-japonicum*

Получените резултати при екстракта от *Cordyceps millitaris,* култивиран в промишлени условия чрез оптимизирания метод демонстрират по-висока антиоксидантна активност спрямо DPPH• радикала, което корелира с резултатите получени за общото фенолно съдържание. Също така ясно се откроява разликата между пробите от свежия мицел спрямо останалите проби от гъбни култури. Вероятно това се дължи на факта, че в началния етап на култивиране натрупването на вещества с антиоксидантна активност е слабо, като по-вероятно на този етап в мицелните култури да има наличие на ензими, участващи в метаболизма на гъбите. Това позволява да се подбира целево модел за култивиране спрямо необходимостта от получаване на биологично активен екстракт. В случаите, когато е необходимо наличие на фенолни съединения с висока антиоксидантна активност да се прилага оптимизирания метод за култивиране до етапа на получаване на плодни тела, а в случаите когато е необходимо получаване на биологично активен екстракт с висока ензимна активност да се приложи метода за получаване на свежа мицелна култура.

5.5.5. Определяне на белтъчно съдържание

Белтъчното съдържание е определено чрез измерване съдържанието на общ азот в пробите от лиофилизиран свеж мицел от медицинските гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis, Cordyceps millitaris* по стандартния метод на Келдал. Резултатите от анализа са представени в **Таблица 20**.

Таблица 20. Резултати за определяне на белтъчно съдържание по метода на Келдал на проби от лиофилизиран свеж мицел от медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis, Cordyceps millitaris*

Наименование	Съдържание на белтък, %
Ganoderma neo-japonicum	16,97
Ganoderma lucidum	16,23
Cordyceps sinensis	20,11
Cordyceps millitaris	22,04

6. Създаване на технология за получаване на функционален биопродукт „*FibrinoZIME*”.

6.1. Определяне на рецептурен състав - качествен и количествен подбор на съставните компоненти на продукта

На базата на предварителните изследвания върху различни видове субстрати за култивиране и получени екстракти от висши медицински гъби са определени видовете и количественото съотношение между подбраните биологично активни субстанции, които ще бъдат включени в състава на новия продукт.

Биоформулата на новия биопродукт е съобразена с изискванията за физиологична активност, безвредност и микробиална стабилност. Той представлява многокомпонентен функционален биопродукт. В състава му са включени източници на градивни и енергийни елементи, както и физиологично активни вещества от различен произход:

- Ферментирал свеж мицел от 4 медицински гъби: *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis, Cordyceps millitaris*. Получената суровина е богата на ензими с протеолитично действие, попадащи в диапазона на ензимите с изразено фибринолитично действие с ниска молекулна маса (в диапазона от 7 - 40 kDa) продуцирани по време на нарастването на свежия мицел, както и със средна и висока молекулна маса (в диапазона от 40 – 100 kDa) продуцирани по време на ферментационния процес предизвикан от *Bacilus Subtillis*.
- Екстракт от мицел на *Ganoderma lucidum* (промишлено отглеждан за период от 9 месеца) – суровината осигурява богат комплекс от биологично активни вещества като β-глюкани, тритерпени, стероли и др., осигуряващи подобряване работата на имунната защита, кръвоносната система, сърдечната дейност и нервната система. β-глюканите са най-често консумираният имуномодулатор поради това, че увеличават устойчивостта на организма към бактериални и гъбични патогени и съответно намаляват силата и честотата на настинки и респираторни инфекции. Бета-глюканите имат голям потенциал при лечението на диабет, като намаляват нивата на кръвната захар, регулират високото кръвно налягане и помагат при алергии.
- Екстракт от плодно тяло на *Cordyceps millitaris* – суровината е с доказано високо съдържание на *Cordycepin*, осигуряващ биологично активно

въздействие за човешкия организъм, като подобряване микроциркулацията в капилярната мрежа, повишаване енергията на клетките, подобряване на защитата срещу вируси и т.н.

- Екстракт от *Natto* – представлява суровина получена от ферментирали чрез *Bacilus Subtillis* соеви кълнове, осигуряваща високо съдържание на фибринолитични ензими с общо наименование Nattokinase с молекулна маса в диапазона от 20 – 30 kDa.
- Екстракт от *Bombyx mori L (intestine)* – суровината осигурява фибринолитичен ензим *Serratia E-15 protease* с молекулна маса 52 kDa за допълване на общия фибринолитичен комплекс и регулиране на крайната ензимна активност на получената дозова форма.
- Екстракт от *Carica Papaya L.* – суровината осигурява ензима *Papain*, който е с доказано физиологично въздействие за рестуктуриране на тъканите при човека, осигуряващо възстановителен ефект на извънклетъчния матрикс при използване на продукта и регулиране на крайната ензимна активност на получената дозова форма.
- *Фруктоолигозахариди (FOS)* – това са нискокалорични, нехраносмилаеми въглехидрати, които се използват като хранителна добавка. Фруктоолигозахаридите подобряват вкуса на храната, нейната трайност и плътност и в същото време действат благотворно на имунната система, костното здраве и баланса на важни бактерии в стомашно-чревната система. Тези съединения се отнасят към пребиотиците, тъй стимулират активно размножаването на стомашно-чревната микробиота в дебелото черво - полезни микроорганизми, които подпомагат усвояването на хранителните вещества и са важни за нормалното храносмилане. Включени в състава на таблетната форма подобряват усвояването на биологично активните вещества.
- *Zn-Citrate* – представлява цинкова сол на лимонената киселина. Тази биологично активна форма осигурява ефективна доставка на елемента Zn, като йонната му форма се освобождава когато вече е преминал елемента в кръвта. Освободения Zn-йон действа като Кофактор за активиране на фибринолитичните ензими.
- *Mg-bis-Glycinate* – представлява комплексна сол на аминокиселината *Glycine* осигуряваща пълно усвояване на елемента Mg през тънките черва по пътя на усвояване на белтъчини. Освободения Mg-йон действа като Кофактор за активиране на всички протеолитични ензими.
- *PVP (polyvinylpyrrolidone*) – представлява безопасен за човешкото здраве полимер който не се усвоява от организма. Използван е в състава като свързващ агент.
- *Микрокристална целулоза* – осигурява омрежена структура на таблетната форма и я предпазва от предварително разрушаване.
- *Mg-Stearate* – представлява сол на стеариновата киселина осигуряваща течливост на микрогранулираната смес в производствения процес.

- SiO_2 – представлява антислепващ агент подобряващ производствения процес.

Подборът на компонентния състав е съобразен с необходимостта от получаване на продукт с балансиран състав и висока биологична стойност.

В изпълнение на програмата по проекта е съставен рецептурен състав на продукта ***FibrinoZIME*** и са изготвени мострени количества от него.

Компонентният състав в количествено съотношение е представен в таблица 21

Таблица 21. Компонентен и количествен състав на функционален продукт ***FibrinoZIME***

Компонент	Количество, g	Съдържание, %
Ферментирал свеж мицел от 4 вида медицински гъби	100	10
Екстракт от мицел на *Ganoderma lucidum*	50	5
Екстракт от плодно тяло на Cordyceps millitaris	50	5
Екстракт от *Natto*	400	40
Екстракт от *Bombyx mori L* (intestine)	300	30
Екстракт от мляко на *Carica Papaya L*	50	5
Фруктоолигозахариди	80	8
Zn-Citrate	10	1
Mg-bis-Glycinate	10	5
PVP (polyvinylpyrrolidone)	10	1
Микрокристална целулоза	30	3
Mg-Stearate	10	1
SiO_2	0,001	0,0001
Общо:	**1000,001**	**100**

Изходните суровини за новия продукт са лиофилизирани, което гарантира високо качество и дълготрайна съхраняемост.

6.2. Лиофилизация на компоненти от състава на продукта.

За успешното осъществяване на процеса лиофилизация особено важно значение имат технологичните фактори: температура на замразяване, температура на доизсушаване, опаковка и условия на съхранение. Тези показатели са проследени през съответните етапи на сублимационното сушене.

Лиофилизацията протече в три фази:

- Първа фаза – **Замразяване** – екстракт от култивирания в течна и твърда хранителна среда мицел от 4 вида висши гъби и плодното тяло от *Cordyceps millitaris* са поставени в специални тави за сублимационно сушене, с дебелина на слоя от 5 до12 mm и са замразени в камера с принудителна конвекция на въздушната среда при температури от -30°C до -37°C в продължение на 12-15 часа;

Процесът на замразяване протича в три последователни стадия: 1) охлаждане до криоскопската температура на повърхността на продукта; 2) замразяване до криоскопската температура в центъра на продукта; 3) замразяване на продукта до зададената температура в термичния център или зададената среднообемна температура.

- Втора фаза – **Сублимация** - при разработване режима на сушене трябва да се отчитат особеностите в състава на продукта, свойствата на

основните компоненти и характера на техните изменения в процеса на обезводняване. Температурният режим на сублимационното сушене е програмиран така, че да се получи оптимална скорост на сушене, която да обезпечи добро качество на крайния продукт. Преди сушене, плочите на инсталацията се охлаждат до температури от -40°C до -55°C. Десублиматорът на инсталацията се охлажда минимално до температура от -55°C до -60°C, с което още в началния период се осигурява достатъчно ниско парциално налягане на водните пари над десублиматора и се създават благоприятни условия за масопренасяне. Процесът протича с отвеждане на водата при -22°/-25°C под дълбок вакуум;

- Трета фаза – **Десорбция** (доизсушаване), чрез нагряване под дълбок вакуум, при положителни температури +28 до + 31°C.

Правилното определяне на температурата и продължителността на изсушаването осигурява получаването на продукти с минимално остатъчно влагосъдържание в границите 2, 25 - 4,7%.

От общотеоретични постановки е известно, че количеството топлина, подвеждано към материала при сушенето, не трябва да е по-голямо от количеството топлина, необходима за сублимирането на леда, защото в противен случай настъпва денатуриране на белтъчините, вследствие повишение концентрацията на електролитите.

Обобщен израз на резултатите от технологичните изпитания, свързани с цялостния цикъл на сублимационното изсушаване на мицел и плодно тяло от висшите гъби е представен в таблица 22.

Таблица 22. Параметри на процеса сублимационно сушене на мицел и плодно тяло от висши гъби.

Параметри/ суровина	Мицел (етап I) Течна хранителна среда				Мицел (етап II) Твърда хранителна среда				Плодно тяло *Cordyceps millitaris*	
	Ganoderma lucidum	*Ganoderma neo-Japonicum*	*Cordyceps Sinensis*	*Cordyceps Militaris*	*Ganoderma lucidum*	*Ganoderma neo-Japonicum*	*Cordyceps Sinensis*	*Cordyceps Militaris*	**ср-а ІМ 1**	**ср-а ІМ 2**
I. Дебелина на слоя / mm	10-12	10-12	10-12	10-12	8-10	8-10	8-10	8-10	5	5
II. Замразяване										
1.Температура на замразяване /°C	-30	-32	-35	-37	-30	-33	-32	-32	-30	-32
2.Евтектична температура / °C	-35	-38	-38	-39	-39	-40	-38	-40	-38	-37
III. Сублимационно сушене										
1.Натоварване на носещата повърхност / kg/m²	9,67	9,02	8,98	9,40	10,02	11,01	9,12	10,2	9,81	10,0
2.Температура на сушене / °C	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25	-22 to -25
3.Температура в десублиматора /°C	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-55 to -60	-50 to -60
4.Налягане в камерата / Pa	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25	20 to 25,
5.Температура на доизсушаване /°C	30	30	31	30	28	29	28	28	30	30
6.Времетраене на процеса / h	21	20	19,5	20,5	14	14,5	13,5	14	20,5	21,0
7. Остатъчно влагосъдържание /%	3,51	4,02	4,7	3,97	2,25	2,40	3,10	2,97	3,2	3,8

6.3. Изготвяне на технологична схема за получаване на твърда дозова форма – таблетка от лиофилизиран функционален биопродукт *FibrinoZIME*

Функционалният биопродукт *FibrinoZIME* е произведен в твърда дозова форма (таблетка) по следния технологичен алгоритъм (фиг. 32):

1. Определяне броя на използваните таблетки за еднократен прием, както и количеството на приема (еднократен или дневен), съдържащи се в една опаковка. Изчисленията се извършват спрямо необходимата за еднократен прием активност от съответната съставка, представена като % от общото съдържание и спрямо него се изчислява необходимото количество от компонента за съответната партида.
2. Измерване количеството на отделните компоненти на продукта – извършва се на работна везна с точност 1g, след което се поставят в чист контейнер снабден с капак или в чист полимерен плик.
3. Смесването и хомогенизирането на отделните съставки на продукта се извършва в блендер или барабан с почистени повърхности.
4. Микрогранулирането се извършва в гранулатор или барабан чрез алкохолен разтвор за гранулиране.
5. Пресирането се извършва на таблет преса, осигуряваща налягане от 15 kN/sm^2,
6. При настройката на пресата се извършва проверка на теглото на таблетката чрез измерване на 10 броя таблетки на лабораторна везна с точност 0,01 g и проверка на твърдостта на таблетката чрез тестер за твърдост при момент на счупване.
7. Заздравяването на таблетната форма се извършва със заздравяващ разтвор, който не прменя качеството на таблетката.
8. Опаковане и етикетиране - готовия продукт се опакова в опаковки, събиращи предвидените дози от продукта, като във всяка отделна опаковка се поставя десикатор съдържащ 0,5-1 g перли силика гел (SiO_2), след което се етикетира и при нужда се опакова в транспортна опаковка .

Фигура 32. Блокова схема на алгоритъма за изготвяне на твърда таблетна дозова форма на функционален биопродукт „*FibrinoZIME”*.



VI. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Установено е, че при култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps Militaris* в течна хранителна среда най-добри резултати при нарастването на мицела са постигнати в обогатените среди М2 (с добавени въглероден източник глюкоза, витамин В1, KH_2PO_4 и K_2HPO_4), последвана от среди М4 и М3, М1, а най-нисък растеж се наблюдава в контролната среда М0.

2. Установено е, че нарастването на мицела при култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps Militaris* на твърда хранителна среда се наблюдава между 30-ти и 90-ти ден, като най-добър резултат и при четирите вида гъби се отчита при хранителна среда S2 (с добавен въглероден източник ориз).

3. Постигнато е нарастване в броя на жизнеспособните клетки при култивиране на щам *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 чрез внасяне в състава на хранителната среда на прахообразни екстракти на *Cordyceps sinensis* и

Ganoderma lucidum. Във вариантните проби с внесени 2 g екстракти до 48-ия час броят на клетките се увеличава с почти 4,5 log единици, а количеството на отмрелите микробни клетки към 72-рия час е малко. Особено ясно това е изразено при хранителната среда с добавен 2 g екстракт от *Ganoderma lucidum*.

4. Постигнато е увеличаване на общата протеолитична активност на хранителната среда за култивиране на *Bacillus Subtilis* NBIMCC 2353 чрез добавяне на нативен говежди колагенов белтък и мицел от *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris*. Най-висока обща протеолитична ензимна активност е установена при 48 час след инокулиране, като вариантите с добавен гъбен субстрат се отличават с по-висока протеолитична активност спрямо варианта с добавен колаген.

5. Постигнато е увеличаване на хитиназната ензимна активност на хранителна среда за култивиране на *Bacillus Subtilis* чрез добавяне на нехидролизирани фрагменти от жив мицел на четирите вида медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris* и хитин от черупки на скариди. Най-висока хитиназна ензимна активност е установена на 48-я час, като тя е по-висока в средите с добавен свеж мицел от гъби спрямо варианта с добавен хитин от скариди и контролната среда

6. Получени са биологично активни екстракти от мицелни култури чрез действието на ензимен комплекс от лаказа, липаза, алфа амилаза и целулаза и чрез ферментация с живи клетки на *Bacilus subtilis.* Разграждането на клетъчната стена е установено с микроскопско наблюдение, а хроматографски са отчетени пикове за фракции на Glucosamin, което е допълнително доказателство за разграждане на хитиновия слой от клетъчната стена на гъбните клетки.

7. Установени са протеинови фракции с молекулни маси в диапазона от 3,7 до 69,2 kDa в белтъчния спектър на проби от медицинските гъби *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps millitaris* и културална течност от *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353, които са максимално близки до молекулните маси на фибринолитичните ензими.

8. Установено е нарастване на съдържанието на *Cordycepin*е с 1,9% и на *Adenosin* с 0,24% в промишлено култивиран *Cordyceps millitaris* в хранителна среда с оптимизиран състав, спрямо хранителна среда със стандартен състав.

9. Експериментално е установено наличие на фенолни вещества в пробите от свежи мицели, отделени след процеса на ферментация. Най-високо съдържание на фенолни вещества 113,66 mg/g се отчита в екстракт от плодно тяло на *Cordyceps millitaris,* култивиран индустриално по оптимизиран метод, което е с 7,14 пъти по-високо спрямо количеството в екстракта от плодно тяло на *Cordyceps millitaris,* отглеждан индустриално по стандартен метод.

10. Определен е антиоксидантен капацитет на екстракти от *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и *Cordyceps millitaris.* Най-висока антиоксидантна активност е доказана при екстракта от *Cordyceps millitaris* - TEAC 1,85 mg/g, култивиран в промишлени услови чрез оптимизирания метод. Ясно се откроява разликата между пробите от свежия мицел, които са с по-ниски стойности спрямо останалите проби от гъбни култури.

VII. ПРИНОСИ

1. Научни приноси

1. Установени са технологични режими на култивиране на висшите медицински гъби *Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis и Cordyceps Militaris* в обогатени хранителни среди.
2. Формулирани са компонентни състави на хранителни среди за култивиране на щам *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки и увеличаване на общата протеолитична и хитиназна активност.
3. Експериментално е доказано наличието на биологично активни компоненти (производни на аденозин (кордицепин), пептиди с различна молекулна маса, фенолен профил и антиоксидантна активност) в екстракти от мицел на *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps millitaris.*
4. Установени са основните параметри на процеса сублимационно сушене на мицел от *Ganoderma neo-japonicum, Ganoderma lucidum, Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps millitaris,* в качеството им на компоненти от състава на функционален биопродукт „*FibrinoZIME”*.

2. Научно- приложни приноси

1. Разработен е метод за ензимно смилане на суровина от гъбен и растителен произход за получаване на водно-базиран екстракт с високо съдържание на биологично активни вещества, чрез използване на комплекс от микробиално продуцирани ензими (лаказа, липаза, амилаза, целулаза и хитиназа) за хидролизиране на биополимерите.
2. Доказана е възможността за използване на щам продуцента *Bacillus Subtilis* като продуцент на комплекс от ензими за хидролизиране на биополимерите. Постигнати са оптимални условия за ензимно смилане при които ферментационния процес може да се провежда за интервал от 12 до 48 часа, и по този начин да се оптимизира технологията за производство на различни суровини.
3. Разработен е метод за култивиране на щам продуцента *Bacillus Subtilis* с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки за по-кратък период от време, чрез оптимизиране състава на хранителната среда с добавяне на

промишлено получен екстракт от *Ganoderma lucidum* и *Cordyceps sinensis* с високо съдържание (40%) на β – глюкани.

4. Разработен е метод за продуциране на свеж мицел от висши медицински гъби (*Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis и Cordyceps millitaris*) в течна хранителна среда с цел получаване на високо съдържание на биологично активни пептиди с ензимно действие. Постигнато е получаване на свеж мицел в сферична форма който лесно може да бъде отделен от течната фаза на културалната среда, което подобрява скоростта на производствения цикъл. Чрез добавяне в състава на хранителната среда на нативни (нехидролизирани фрагменти – биополимери, в това число специфични белтъчини, хитин и др) процеса на култивиране успешно се насочва към продуциране на пептиди с насочено ензимно действие (общо протеолитично, фибринолитично, целулазно, хитиназно).

5. Разработен е аналитичен метод за определяне нарастването на свежия мицел, при който се използва съотношението на обемните части заети от сферите на свежия мицел спрямо останалата заета от културалната течност част от общия обем. ($V_m = V_{p-p} - V_{Liquid}$), V_m- обем на мицелните сфери, V_{p-p}- общ обем на разтвора заедно с мицела, V_{Liquid}- обем на отдекантираната културална среда.

6. Разработен е метод за продуциране на мицела от висши медицински гъби (*Ganoderma lucidum, Ganoderma neo-japonicum, Cordyceps sinensis и Cordyceps millitaris*) върху твърда хранителна среда обогатена с ориз с цел получаване на високо съдържание на биологично активни полизахариди (β – глюкани). При този метод времето за дълбочинно култивиране на мицелната култура с цел увеличаване на полизахаридите е намалено от 270 дни (при стандартните промишлени подходи) на 90 дни.

7. Експериментално е приложен полупромишлен метод за продуциране на мицел и плодно тяло от висши медицински гъби (*Cordyceps sinensis и Cordyceps millitaris*) върху твърда хранителна среда, като е постигнато увеличение съдържанието в екстракта на *Cordycepin, Adenosin* и неговите производни 5,25 пъти спрямо стандартните методи за производство.

8. Формулиран е рецептурен състав и е разработена технология за производство на функционален продукт - „*FibrinoZIME"*с физиологична насоченост към разграждане на фибринов и амилоиден белтък с цел изчистване от организма и намаляне на патогенните ефекти причинени от натрупване на плаки в тъканите.

9. За първи път в новия функционален продукт - „*FibrinoZIME"*е използвано комбинирано действие на различни ензими с фибринолитично действие, различаващи се по молекулната маса (от 10 до 110 kDa), което осигурява увеличаване на биологично активното действие дължащо се на способността на ензимните пептиди да преминат през всички биологични бариери в човешкия организъм и по този начин да участват в процеса на

възстановяване при голям брой социално значими заболявания свързани с образуването на плаки в тъканите.

10. Приложен е методът на лиофилизация на изходните суровини за новия продукт, което гарантира високо качество и дълготрайна съхраняемост.

Приложни приноси

1. Разработена е технологична схема за производство на плодно тяло и екстракт от *Cordyceps millitaris* с повишено съдържание на Cordycepine.

2. Установени са параметрите на полупромишлено производство на *Cordyceps millitaris* в реални условия във ферма за отглеждане на медицински гъби с предприятие за производство на екстракти, намиращо се в град Джинхуа, Китай.

IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

Научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световно известни бази данни с научна информация.

1. **Solakov, N.,** 2018. Optimization of the method for the extraction of biologically active substances from fresh vegetable raw materials by enzymatic hydrolysis and cryogenic concentration, *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans,* Vol.21, №. 6, pp.68-80, ref.5, ISSN 1311-0489 (Print).

2. **Solakov Nikolay,** Milena Kostova, Kamelia Loginovska, Zlati Markov, Ana Caroline de Oliveira, and Yordan Muhovski. 2022. "Investigation of Adenosine Precursors and Biologically Active Peptides in Cultured Fresh Mycelium of Wild Medicinal Mushrooms, " *Applied Sciences* 12, no. 20: 10618. https://doi.org/10.3390/app122010618

Научни публикации в нереферирани списания с научно рецензирани или редактирани колективни томове.

1. Solakov N., A. Valchkov, 2020. Optimization of the process of lyophilization of microbial culture of *Bacillus subtilis NBIMCC 2353* by ultrasound. *International Journal of Development Research*, Vol. 10, Issue, 11, pp. 42163-42166, November, 2020 ISSN-L2230-9926.

X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Участие в 21-та научна конференция с международно участие „ЕкоМаунтин- 2018“ ИПЖЗ - гр. Троян .
2. Участие в Национална научна конференция с международно участие “90 години творчество, растеж, развитие в аграрната наука“,18-19 октомври 2018г., НЦЖЗ - гр. Смолян.
3. Научна конференция за студенти и млади учени с международно участие "45 години висше образование- Стара Загора" на 09.05 - 11.05.2019 г. Тракийски университет, гр. Стара Загора, факултет „Техника и технологии“, гр. Ямбол.

4. Научна конференция с международно участие "Животновъдната наука - предизвикателства и иновации"- ИЖН – Костинброд, проведена online на 05.11.2020г.

XI. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. **ССА - Проект № ТН 10**: „Получаване на ферментирали лиофилизирани продукти на основата на биоактивни протеинови хидролизати“, 2021 –2023 г.
2. **ССА - Проект ХТАИ – №146** „Получаване на здравословни храни на основата на биологично активни компоненти от растителен и животински характер“, 2018 -2020 г.

Задача 1: „Създаване на функционален биопродукт на основата на коластра по биотехнологичен път“

Задача 2: „Разработване на технология за получаване на млечнокисели напитки и меки сирена от млечна суроватка“

3. **ССА- Проект ХТАИ – ТН_2** „Алтернативни биотехнологични подходи за подобряване защитата и продуктивността при земеделските култури“, 2019-2022 г.
4. **ССА- Проект Ж 155** „Съхранение и използване на генетичните ресурси в говедовъдството, овцевъдството и козевъдството за производство на мляко и месо в планинските райони на България“, 2019 -2021 г.
5. **ФНИ, МОН - Проект № КП-ОБ-М26/7** “Криогенен метод с ултралиофилизация за запазване на биологичната активност на екстракти от микробиални източници“, 2018 -2020 г.
6. **ФНИ, МОН- Проект № КП – 06 ПН39/15** „Разработване и усъвършенстване на нови подходи за качествена и количествена оценка на радиационно третиране на базата на ЕПР спектроскопия“, 2019 -2021 г.

7. **МОН, Национална Научна Програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“ , 2019-2022г.**

Компонент 2: Растително здраве и безопасност в хранителните системи

РП 2.3. Тема: „Алтернативни подходи с прилагане на биостимуланти за стабилизиране на добивите и продукция с висока биологична стойност при бобови култури“

Компонент 3: Качество на храните за по-качествен живот

РП 3.1. Тема: „Иновативна технология за производство на лиофилизирани симбиотични концентрати“

XII. ОБУЧЕНИЕ И НАГРАДИ

1. Сертификат за успешно завършен научно-практически курс по вътрешен одит за HACCP система по теми: „HACCP система – разработване и въвеждане; вътрешен одит на системите за управление на безопасността на храните; общи ринципи и прилагане на законодателството на ЕС в областта за осигуряване на прослеследимост на храните;;; етикетиране, енергийна стойност на храните“, организиран от Съюза по хранителна промишленост и проведен в Дома на техниката, гр. София на 2-4.09.2019г.

2. Диплома в конкурс за иновации, раздел „Научна дейност и разработки“ за „Биологично активен ензимен продукт *FibrinoZIME*“ от Международната селскостопанска изложба Агра 2020.

3. Свидетелство № 01/20.06.2022г. за научен продукт, приет от Постоянната комисия за иновации и технологии към ССА за „Функционален лиофилизиран продукт “Fucostem”.