

addition of sea water salts, whereas there were no considerable differences among these parameters during cell cultivation on Ba^{2+} ; Na_2SO_4 or control media.

СУПРУН С. М., ДОНЧЕНКО Г. В., ПАРХОМЕНКО Ю.Ф., *КУРЧЕНКО И. Н., *ХАРКЕВИЧ Е.С., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: kich@biochem.kiev.ua

**Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, 03143 ул. Заболотного, 154, e-mail: irinakurchenko@ukr.net*

БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ, ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

Грибы - ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно: незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, витаминоподобных веществ, таких как убихинон Q_{10} и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимутогенов. Тот факт, что грибной белок по своему аминокислотному составу не уступает животному, а также то, что другие важные биологически активные вещества, содержащиеся в грибах является основанием для использования грибов для получения пищевых и кормовых добавок. Биологическая ценность биомассы грибов зависит от состава клеточной стенки, остов которой составляют гликозаминогликаны, а также хитин обладающий свойством природного сорбента. Использование микромицетов позволило разработать новые биотехнологии получения липидов, витаминов, β -каротина из *Blakeslea trispora*, пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса. Микромицеты являются перспективными для использования в различных отраслях народного хозяйства: сельском хозяйстве, медицине, а также в защите окружающей среды. Более того, использование микромицетов для получения витаминов представляет реальную альтернативу химическому синтезу [1-4].

Цель работы - селекция штаммов микромицетов-продуцентов витаминов, коферментов и разработка биотехнологии получения на их основе витаминно-коферментного препарата.

Материалы и методы

Нами был использован метод поэтапной селекции для отбора штаммов-продуцентов витаминов, коферментов среди различных таксономических групп микромицетов музейных культур коллекции Украины. Для получения витаминно-коферментного препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-10011 - продуцент витамина РР (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Penicillium sclerotiorum* 10015-продуцент β -каротина, белка. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах или в производственных условиях на лабораторной стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО "Стиролбиотех". Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5%-ным инокулятом. Продолжительность культивирования в лабораторных условиях составляла в зависимости от поставленных целей до 62-72 часов, а в производственных для получения препарата, с отработанной технологией процесс культивирования составлял - 42–48 часов. Получено две формы препарата - порошкообразную и жидкую (гранулированную при внесении наполнителя.). Жидкую

форму препарата получали по разработанной нами технологии с использованием термической обработки. Содержание витаминов и других биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли с использованием методов, приведенных в справочнике по микологии [5].

- убихинон Q₁₀ — спектрофотометрически с предварительным хроматографическим разделением компонентов неомыляемых веществ [6];

- содержание хитина в биомассе по разнице количества N-ацетилглюкозамина после гидролиза соляной кислотой и производили перерасчет количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1.17 [4].

- содержание НАД определяли в аликвотах кислоторастворимого экстракта с помощью дрожжевой алкогольдегидрогеназы [7].

Витаминно-коферментный препарат был протестирован на животных: дубовом шелкопряде, рыбах, перепелах. В первом опыте использовали гусениц дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M., которых обрабатывали препаратом при разведении (1:20). Корм контрольных гусениц в соответствующие периоды обрабатывали водой.

Во втором опыте для обработки икры карпа *Ciprinus carpio* L. (0,5 кг), полученной от одной самки, использовали грибной препарат, разведенный водой (1:1), который вносили в объеме, равном объему икры, за 1 мин до окончания оплодотворения сухим способом. В контроле в процессе инкубации применялась профилактическая антисепролегниозная обработка фиолетовым "К" (в опыте обработка химическими препаратами не проводилась). В третьем опыте использовали две группы перепелов - контрольную и опытную по 90 голов каждая (45 самцов и 45 самок). В комбикорм опытной группы вводили препарат, который позволил увеличить уровень сырого протеина в комбикорме на 1,5%. Длительность опыта была 28 дней, препарат вводили, начиная с 14 дня.

Результаты и обсуждение

Предварительная селекция позволила нам отобрать несколько штаммов микромицетов, которые были перспективными продуцентами биологически активных соединений, в частности, витаминов и коферментов. Так штамм *Fusarium sambucinum* синтезировал и накапливал повышенные количества никотиновой кислоты и ее производные, коэнзима А (КоА), убихинона Q₁₀; штамм *Mycelia sterilia* (white) – тиамин и его производных, белка; *Penicillium sclerotiorum* –β-каротин и белка; *Penicillium vitale* – флавинадениндинуклеотида (ФАД). При изучении действия предшественников биосинтеза витаминов и коферментов на их конечный выход обнаружено, что введение триптофана в культуральную среду повышает выход никотиновой кислоты, а введение самой никотиновой кислоты – выход ее коферментной формы – никотинамидадениндинуклеотида (НАД). Изучены условия биосинтеза КоА и ФАД штаммами-продуцентами. При добавлении в реакционную смесь предшественников синтеза КоА и ФАД их выход значительно повышался. Отмечено, что в условиях стимуляции никотиновой кислотой синтез НАД наблюдалась интенсификация роста мицелия, а также раннее образование в культуре конидий. На бесклеточном экстракте *Fusarium sambucinum*, который выращивали в среде с ниацином и триптофаном, показано снижение в этих условиях активности пиррофосфорилазы. Изучение активности ключевых ферментов биосинтеза НАД - триптофанпиролазы и НАД-пиррофосфорилазы позволило установить существование двух путей биосинтеза НАД в клетке гриба-продуцента. Внесение в среду аденозина одного из предшественников синтеза АТФ приводило к активации НАД-пиррофосфорилазы, что стимулировало запасной путь сверхсинтеза НАД у *Fusarium sambucinum*.

Результаты проведенного исследования создали предпосылки для дальнейшей разработки биотехнологий получения отдельных витаминов с использованием

грибных штаммов-продуцентов. Грибная биомасса, обогащенная витаминами, уже сейчас может быть использована как основа для получения лечебно-профилактических препаратов.

Основываясь на изучении их физиолого-биохимических особенностей, биосинтеза отдельных витаминов, скорости роста, отсутствие антагонизма, были отобраны культуры для совместного культивирования с целью получения кормовой и пищевой добавки. Для получения витаминно-коферментного препарата подобраны культуры *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011-продуцента никотиновой кислоты и ее производных, продуцента кофермента КоА и белка незаменимых аминокислот (лизина и триптофана) и *Penicillium sclerotiorum* – продуцент β-каротина. Нами отработаны условия их совместного культивирования и согласно регламенту на стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех» были наработаны партии препарата. В результате совместного культивирования в 2-3 раза увеличивается содержание исследуемых витаминов и количество белка в препарате, а также сокращаются сроки ферментации до 46 часов.

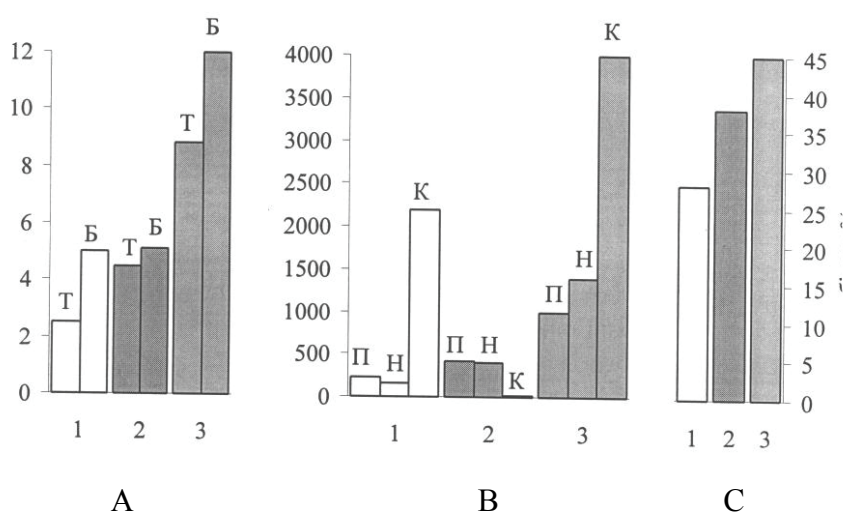


Рис. Содержание витаминов (А,В, мкг/г сухого веса) и белка (%) при моно- и совместном культивировании штаммов-продуцентов: 1-*Penicillium sclerotiorum*; 2-*Fusarium sambucinum*; 3-совместное культивирование; Т-тиамин; Б-биотин; П-пантотеновая к-та; Н-никотиновая к-та; К-каротиноиды

Полученный витаминно-коферментный препарат представляет собой комплекс природных биологически активных веществ (витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество никотиновой кислоты и ее производных, в частности NAD (6,0 мг/г с.в.), β-каротин, тиамин, витамин Е, витамин В₁₂, фолиевую кислоту.

Данный препарат испытан в опытах на шелкопрядах, икре карпа, перепелах. Использование препарата способствовало значительному повышению жизнеспособности гусениц: на 14,8 %, массы кокона и шелковой оболочки до 11,2 % и 12,8 %, соответственно. Более того, полученный препарат позволяет защищать полезных насекомых от инвазийных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза). Применение препарата приводило к снижению заболеваемости ядерным полиэдрозом на 9–12 %.

В экспериментах по обработке икры карпа биопрепаратом было обнаружено, что выход личинок из подопытной икры в условиях тепловодного хозяйства составил около 100 %, тогда как выход в контроле не превышал 74 %. Применение витаминно-коферментного препарата повышает процент выхода личинок из икры, а также снижает пораженность их сапролегниозом. В опытах с перепелами было отмечено повышение

массы молодняка, начиная с 21 дня, а по достижению 28 суток живой вес исследуемых птиц в опыте составлял $124,5 \pm 1,1$, а в контроле $116,6 \pm 1,5$ г. Эти данные свидетельствуют о том, что исследуемый препарат может использоваться в качестве лечебно-профилактического средства.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используя метод поэтапной селекции различных таксономических групп микромицетов музейных культур коллекции Украины, нами отобраны наиболее перспективные штаммы-продуценты витаминов, коферментов. Продемонстрировано, что биологическая ценность полученного грибного препарата определяется тем, что он наряду с природным комплексом биологически активных веществ содержит значительное количество жизненно важных витаминов. В составе исследуемого препарата преобладают такие витамины, как: никотиновой кислоты и ее биологически активные формы, тиамин, витамин Е и β -каротин, соединения с чрезвычайно широким спектром действия. Все вышеупомянутые витамины принимают активное участие в основных метаболических путях живых организмов, способствуя их физиологическому протеканию. Применение витаминной грибной биомассы способствует повышению функционирования иммунной системы живых организмов, что обосновывает возможность применения ее, в качестве основы для получения лекарственных средств, как в медицине, так и сельском хозяйстве.

Литература

1. *Wainwright M.* Novel use for fungi in biotechnology // *Chem. Ind.*-1990. № 2. P. 131–134.
2. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Santa Cruz, С.А. 1995. 251 p.
3. *Беккер З. Е.* Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 260 с.
4. *Феофилова Е. П., Немцев Д. В., Терешина В. М., Козлов В. П.* Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // *Прикладная биохимия и микробиология.*-1996. т.32, № 5. - С. 483–492.
5. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии.-1982 .- 550 с.
6. *Донченко Г.В.* Биохимия убихинона Q. - 1988.- 297 с.
7. *Bergmeyer H.U.* Methods of Enzymatic Analysis. - New York; London: Verlag Chemie, 1963. - 1064 p.

Резюме

Селекционированы штаммы-продуценты витаминов: *Fusarium sambucinum* – продуцент никотиновой кислоты и ее производных форм, *Penicillium sclerotiorum* - β -каротина и белка. На основе изучения их физиолого-биохимических свойств разработана биотехнология получения биопрепарата при совместном культивировании отобранных штаммов, что позволило сократить сроки ферментации и повысить выход биологически активных веществ. Испытания грибного препарата с высоким содержанием витаминов, коферментов и других биологически активных веществ обосновывает возможность его применения в качестве кормовой и пищевой добавки.

Селекціоновані штами – продуценти вітамінів та коферментів : *Fusarium sambucinum* – продуцент нікотинової кислоти та її похідних, *Penicillium sclerotiorum* - β -каротину та білку. На основі вивчення їх фізіолого-біохімічних властивостей розроблена біотехнологія отримання біопрепарату при сумісному культивуванні штамів мікроміцетів, що дозволило скоротити терміни ферментації та підвищити вихід біологічно активних речовин. Випробування грибного препарату з високим вмістом вітамінів, коферментів та інших біологічно активних речовин обґрунтовує можливість застосування його в якості кормової та харчової добавки.

Micromycetes strains were selected: *Fusarium sambucinum* – nicotinic acid producer and its derivatives, *Penicillium sclerotiorum* - β -carotene and protein. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical property was developed using joint cultivation of selected strains. This approach has allowed reduce the terms of fermentation and augment the output of biologically active substances. The test of fungal preparation which had high content of vitamins, coenzymes and other biologically active substances proves the possibility of its using as food and chow additives.

**ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р¹, ЮРЬЕВА Н.О², БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н.¹,
ГОРДУКОВА М.А.¹, ЦЫДЕНДАМБАЕВ В.Д.², НОСОВ А.М.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.¹**

¹*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).*

Россия, Москва, ул. Губкина 3. 119991

e-mail: chris@vigg.ru

²*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН (ИФР РАН)*

Россия, Москва, ул. Ботаническая 35. 127276

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ, ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Известно, что одной из первичных ролей в способности растений к перенесению холода отводится мембранным липидам. Молекулы липидов в мембране образуют двойной слой, в котором гидрофобные концы жирных кислот обращены друг к другу, а гидрофильные головки образуют заряженный слой на поверхности мембран. При нормальной температуре и оптимальном осмотическом давлении мембрана представляет собой жидко кристаллическую структуру, обладающую определенной степенью текучести. Термин «текучесть» используется для описания степени неупорядоченности и физической подвижности внутри липидного бислоя мембран. При снижении температуры или гипертоническом шоке, молекулы жирных кислот приближаются друг к другу. По сути, это означает сжатие мембраны и уменьшение ее текучести. При определенных условиях может наступить критический момент, когда большая часть липидов потеряет свою подвижность настолько, что произойдет фазовый переход из жидко-кристаллического состояния в состояние геля. Это приведет к гибели клетки, если она будет не в состоянии поддерживать свои мембраны на определенном уровне текучести. Главными причинами смертельного исхода являются уменьшение подвижности белков в липидном бислое, их неспособность к изменению конформации и как следствие - полная потеря своих функций. При отклонении температуры от нормальной в сторону ее повышения либо при гипотоническом шоке, мембраны растягиваются, то есть возрастает подвижность липидных молекул в бислое и текучесть мембран увеличивается. Этот процесс может привести к разделению липидной фазы и полному разрушению мембранных структур. Обычно клетки обладают защитными системами для контроля над состоянием своих мембран и в момент изменения условий среды активируют эти системы. Так при снижении температуры активируется синтез десатураз. Десатуразы – это ферменты, которые вводят двойные связи в молекулы жирных кислот, и характеризуются высокой субстратной специфичностью. Следует отметить, что в ряде работ говорится о ключевой роли ненасыщенных ЖК в ответных реакциях растений не только на изменение температуры, но и на атаки фитопатогенов. В тоже время роль десатураз в механизмах адаптации биологических мембран и растений в целом до