

СУПРУН С.М.<sup>1</sup>, ДОНЧЕНКО Г.В.<sup>1</sup>, КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.<sup>1</sup>, ПАРХОМЕНКО Ю.М.<sup>1</sup>, ИСАЕВА Н.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: kuch@biochem.kiev.ua

<sup>2</sup>Институт зоологии им. И.И.Шмальгаузена НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Б. Хмельницкого, 15, e-mail: morleone2000@hotmail.com

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРИБНОГО ПРЕПАРАТА

Микромицеты являются перспективными для использования в различных отраслях народного хозяйства – защите окружающей среды, сельском хозяйстве, медицине. В настоящее время известно более 100 биотехнологий с применением различных таксономических групп грибов для получения ферментов, витаминов, антибиотиков полисахаридов и лекарственных средств [1,2]. Грибы - ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, таких витаминоподобных веществ, как убихинон Q<sub>10</sub> и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимуtagens. Известно, что грибной белок по аминокислотному составу не уступает животному, что является основанием их использования для получения пищевых и кормовых добавок. На биологическую ценность биомассы грибов влияет состав клеточной стенки, которая, содержит хитин и его производные, которые могут выполнять функции природных сорбентов. Грибы нетребовательны к субстрату для культивирования, устойчивы к изменениям природных условий, технологичны. Цель исследований: разработка биотехнологии получения пищевой и кормовой добавки на основе селекционированных штаммов продуцентов витаминов, коферментов и белка.

### Материалы и методы

Использовали метод поэтапной селекции для отбора штаммов белково - витаминных продуцентов среди различных таксономических групп микромицетов. Для получения витаминно-коферментного препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-10011 - продуцент витамина PP (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Fusarium sambucinum* F-139 - продуцент CoA и 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 (инокулят) 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 62 часа, а в производственных — 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 биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли с использованием методов, приведенных в справочнике по микологии [6]:

- убихинон Q<sub>10</sub> — спектрофотометрически с предварительным хроматографическим разделением компонентов неомыляемых веществ [7];

-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.

Витаминно-коферментный препарат был протестирован на животных: дубовом шелкопряде, рыбах, перепелах и белых мышах. В первом опыте использовали гусениц дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M., которые обрабатывали препаратом в 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 антисапролегниозная 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 повысить уровень сырого протеина в комбикорме на 1,5%. Длительность опыта 28 дней, препарат вводили начиная с 14 дня.

В четвертом опыте биотестирование препарата проводили в двух сериях опытов на трех группах мышей по 7 особей в каждой. Длительность экспериментов составляла 21 сутки. Животные, содержащиеся на стационарном рационе вивария, получали биопрепарат из расчета 0,36 г/особь для 1-й подопытной группы и 1,8 г/особь для 2-й группы. Контролем служили мыши, которые содержались на стандартном рационе вивария. Для оценки влияния биопрепарата использовали такие критерии: поведенческие реакции животных, потребление корма и воды, выживаемость, показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарная формула, свертываемость крови) и биохимические тесты: уровень белка в сыворотке крови и отдельных ее фракциях, активность сывороточной холинэстеразы, содержание аммиака в ткани мозга, а также морфоструктура внутренних органов. Определение выше указанных показателей проводили общепринятыми методами.

### **Результаты и обсуждение**

Нами селекционированы штаммы белково-витаминные продуценты: *Mycelia sterilia* ИМВ, *Fusarium sambucinum* F-139, *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011, *Penicillium sclerotiorum* F-10015. Основываясь на изучении их физиолого-биохимических особенностей, биосинтеза отдельных витаминов, скорости роста, отсутствие антогонизма, 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, незаменимых аминокислот (лизина и триптофана) и *Fusarium sambucinum* F-139 - продуцента кофермента CoA и белка. Нами отработаны условия их совместного культивирования и согласно регламенту на стенодовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех» были наработаны партии препарата. В результате совместного культивирования в 2-3 раза повышается содержание исследуемых витаминов, увеличивается количество белка в препарате, сокращаются сроки ферментации до 46 часов. 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  $\text{NAD}^+$  (6,0 мг/г а.с.в.), тиамина, витаминов E, витамина B<sub>12</sub>.

Полученный препарат испытан в опытах на шелкопрядах, икре карпа, перепелах и лабораторных мышах. Использование препарата способствовало значительному

повышению жизнеспособности гусениц: на 14,8 %, массы кокона и шелковой оболочки до 11,2 % и 12,8 %, соответственно. Полученный препарат позволяет защищать полезных насекомых от инвазийных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза). При применении препарата снизилось заболевание ядерным полиэдрозом на 9–12 %.

При обработке икры карпа биопрепаратом выход личинок из подопытной икры в условиях тепловодного хозяйства Киевской ТЭЦ–5 составил около 100 %, тогда как выход в контроле не превышал 74 %. Таким образом, можно сделать вывод, что данный биопрепарат повышает, во-первых, процент выхода личинок из икры, снижает пораженность их сапролегниозом и, во-вторых, увеличивает стойкость личинок, вышедших из обработанной биопрепаратом икры, по отношению к неблагоприятным факторам внешней среды. В опыте с перепелами отмечено повышение массы молодняка начиная с 21 дня, к 28 суткам живой вес в опыте составлял  $124,5 \pm 1,1$ , а в контроле  $116,6 \pm 1,5$  г %.

В эксперименте с мышами установлено, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, корм они поедали полностью, водопотребление обычное. Выживаемость животных в подопытных группах составила 100 %, т.е. была выше, чем в контроле. Темпы прироста массы тела не имели межгрупповых различий. Результаты исследований периферической крови свидетельствуют о том, что уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов у подопытных мышей находилось в пределах физиологических норм. При исследовании лейкоцитарной формулы установлено преобладание лимфоцитов и сегментоядерных форм. Зафиксированное снижение палочкоядерных форм лейкоцитов можно расценивать как положительный фактор. Что касается свертывающей способности крови, то она сохранялась без изменений.

Включение в экспериментальные рационы мышей биопрепарата приводило к некоторому снижению уровня альбуминов у подопытных животных по сравнению с контрольными величинами и повышению  $\gamma$ -глобулиновой фракции сывороточных белков.

О благоприятном влиянии исследуемого витаминно-белкового препарата на организм мышей свидетельствуют и показатели активности сывороточной холинэстеразы. Также отмечено снижение в 2,85 раза количества аммиака в ткани мозга мышей, получавших препарат из расчета 1,8 г/особь и идентичность уровней данного метаболита азотистого обмена с контролем в ткани мозга мышей в другом варианте опыта.

### **Выводы**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биологическая ценность грибного препарата состоит в том, что он содержит природный комплекс биологически активных веществ, а также значительное содержание витаминов. Высокое содержание витаминов, в частности, никотиновой кислоты и ее производных в препарате, соединений с чрезвычайно широким спектром действия, способствует улучшению обменных процессов в организме и повышению иммунитета, что свидетельствует о возможности использования его, как основы для получения лекарственных средств.

Применение биопрепарата не только повышает выживаемость животных, физиологические и производственные показатели шелкопряда и рыб, но также защищает их от инвазионных (микроспориоз дубового шелкопряда) и инфекционных заболеваний, как например, дубового шелкопряда - от полиэдроза, икру карпа - от сапролегниоза. Результаты испытания грибного препарата позволило обнаружить его благоприятное влияние на рост и развитие теплокровных животных, гематологические и биохимические их показатели, что позволяет прогнозировать

эффективность дальнейшего использования биопрепарата в сельском хозяйстве, а также для получения на его основе лекарственных средств.

#### Литература

1. *Wainwright M.* Novel use for fungi in biotechnology // *Chem.* 1990. № . P. 131–134.
2. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. 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. — 32, № 5. - С. 483–492.
6. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии.-К.Наукова думка,1982 С.261-268.
7. *Донченко Г.В.* Биохимия убихинона Q. К.:Наук.думка, 1988.- 297 с.

#### Резюме

Разработана биотехнология получения биопрепарата при совместном культивировании штаммов микромицетов *Fusarium sambucinum* F-139 и *Fusarium sambucinum* F-10011, что позволило сократить сроки ферментации и повысить выход биологически активных веществ. Испытания грибного препарата с высоким содержанием витаминов, коферментов и других биологически активных веществ свидетельствуют о возможном применении его в качестве кормовой и пищевой добавки.

Розроблена біотехнологія отримання біопрепарату при сумісному культивуванні штамів мікроміцетів *Fusarium sambucinum* F-139 і *Fusarium sambucinum* F-10011, що дозволило скоротити терміни ферментації та підвищити вихід біологічно активних речовин. Випробування грибного препарату з високим вмістом вітамінів, коферментів та інших біологічно активних речовин свідчить про можливе застосування його в якості кормової та харчової добавки.

The biotechnology of obtaining of fungial preparation based on joint cultivations of micromycetes strains of *Fusarium sambucinum* and *Fusarium sambucinum* was developed. Joint cultivation of strains has allowed to reduce the terms of fermentation and augment the output of various biologically active substances. The preparation has high content of vitamins and other biologically active substances that suggest the possibility of its using as food and chow additives.

#### **ФУРСОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А.**

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН РФ,*

*Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: oksfursova@yandex.ru*

#### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИИ ДВУХ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, КАК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ОТВЕТА НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС У РАСТЕНИЙ.**

Ранее методом агробактериальной трансформации прорастающих семян (Томилов и др., 1999) с использованием вектора pLD3 (Гапеева и др., 1995) был получен и описан инсерционный мутант *Arabidopsis thaliana*, характеризующийся нарушением морфогенеза семядолей на ранних стадиях развития растений (Томилова и др., 2001). Анализ ДНК с использованием ПЦР, блот-гибридизации и компьютерного анализа позволил определить, что геном мутанта несет одну инсерцию, сцепленную с