

PRODUCTION OF HYPHOMYCETOUS AIR CONIDIA BASED ON DIFFERENT VARIANTS OF TWO STAGE TECHNOLOGY
Gouli V.V., Gouli S.Y., Parker B.L., Skinner M., Burdjanadze M.

Университет Вермонта
Берлингтон, США

Hyphomycetous fungi include numerous entomopathogenic and antagonistic species representing interest as source of microbial pesticides. Typically, the active ingredients in fungal formulations used for pest control are aerial spores, e.g., conidia. Despite the simplicity of this active ingredient, the equipment used in the microbial industry today is relatively inadequate for the purpose of producing fungi in any substantial quantity at a reasonable cost. As a general matter, the production equipment utilizes submerged cultivation processes to produce the products based on heterotrophic microorganisms. Because hyphomycetous fungi and other groups of fungi require solid substrata, the type, design and facilities necessary to produce spores on a large scale are not readily feasible. There are two principal production techniques for entomopathogenic and antagonistic fungi. The first technique includes two stages. In the first stage, submerged cultivation of fungi occurs, where the fungal biomass is transferred to flat-bottomed baths for support maximal contact with air surroundings. The fungus in flat-bottomed baths forms superficial film that includes mycelia and aerial conidia. The superficial film is removed from the bath, dried, and formulated. The second known type of production technique involves the cultivation of fungi using different solid substrata, such as grain (e.g., sorghum, rice, wheat, millet, etc.).

We have proposed the two new methods for processing of fungal biomass obtained using submerged cultivation for production of air conidia. The first method is connected with utilization of tubular structures which include two layers. One layer is a hygroscopic material (paper or fabric), and second is any material with irregular surface for example the sheets of bubble-packing material. Fungal biomass is distributed in consecutive order on tape of hygroscopic material. The tape as covering with liquid biomass is twisted together with second tape with irregular surfaces. As a result, it is formed the tubular roll, where second type is provided the aeration of tubular structures.

The second method is connected with utilization special organic polymer. The polymer is adsorbed the fungal material, and provided the development of surface area. Productivity of traditional two stage method and new two methods were compared. Two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii*, and antagonistic fungus *Trichoderma viridae* were used for these experiments. Submerged conidia of fungi were produced in a liquid medium containing 6.2 g l^{-1} whey powder. The inoculated 200 ml medium in 500 ml Erlenmeyer flasks was incubated in a G25 Gyrotory shaker at 150 rev/min and at $25^0 \pm 2C^0$ for 72 h. The remaining cultures were used for the production air conidia using three different technologies. Traditional two stage method has given from 1 liter medium following number of air conidia: *B. bassiana* $1.4 \pm 3 \times 10^{11}$; *L. lecanii* $2.0 \pm 0.4 \times 10^{10}$; *T. viridae* $1.1 \pm 0.2 \times 10^{11}$. Production of fungi helping the multi-layer roll-method and method based on special polymeric granules was higher from two to five times. Additional useful properties of the new roll method of air conidia production are linked with possibility to prepare the original delivery system (insect traps, seed and root protection systems and others). The polymer granules allow preparing the jelly-forms formulation including all active fungal components.

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПОГРУЖЕННОГО МИЦЕЛИЯ ВИДОВ Р. *CORDYCEPS*.

Автономова А.В., Леонтьева М.И., Исакова Е.Б., Белицкий И.В., Бухман В.М., Краснопольская Л.М.

НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе РАМН
Москва

Грибы рода *Cordyceps* известны в традиционной медицине Китая более тысячи лет. Китайцы считают кордицепс талисманом, приносящим здоровье и долголетие. Эти грибы использовали для укрепления здоровья, повышения жизненного тонуса, лечения многих заболеваний таких как бронхит, пневмония, стенокардия, онкологические заболевания, туберкулез, цистит, пиелонефрит, гломерулонефрит, гепатит, цирроз, ревматизм, преждевременное старение, и это далеко не полный список. Одним из важнейших направлений исследований грибов этого рода является изучение их противоопухолевых свойств и поиск активных метаболитов.

В настоящей работе была изучена противоопухолевая активность препаратов погруженного мицелия видов *C. sinensis*, *C. sobolifera*, *C. ophyogloides* и *C. militaris* из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН. Противоопухолевое действие было оценено на модели подкожно трансплантированного Т-лимфолейкоза Р388 мышам ВДФ1 при пероральном введении препаратов.

Полученные результаты показали, что сухая биомасса грибов р. *Cordyceps* обладает выраженной противоопухолевой активностью. Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО) на 14 сутки опыта у мышей, получавших биомассу *C. sobolifera*, составил 73%, *C. sinensis* - 65%, *C. ophyogloides* - 35% и *C. militaris* - 34%. Сравнение различных доз введения сухой биомассы *C. sobolifera* не выявило достоверного различия между дозами 50, 100 и 150 мг/кг/сутки. В отличие от биомассы водные экстракты сырой погруженной биомассы *C. sinensis* и *C. sobolifera* оказали сильное стимулирующее действие на рост подкожного опухолевого узла в использованной модели. В опытных группах у мышей, которым вводили водные экстракты этих грибов, опухоль росла в два раза быстрее, чем в контроле. Водный экстракт сырой биомассы *C. ophyogloides* оказал слабое тормозящее действие на рост опухоли. ТРО для водного экстракта сырой биомассы *C. ophyogloides* на 14 сутки опыта составил 35%, на 17 сутки – 38%. Препарат, объединяющий этанольный и водный экстракты сухой биомассы *C. sobolifera*, проявил выраженное противоопухолевое действие, демонстрируя более сильный эффект, чем сухая погруженная биомасса этого гриба.

Таким образом, из погруженной биомассы исследованных штаммов *C. sinensis*, *C. sobolifera*, *C. ophyogloides*, *C. militaris* можно получить препараты, обладающие выраженной противоопухолевой активностью. Проведение такой работы, программы и методики биологического контроля создаваемых субстанций и уже существующих продуктов требуют особой тщательности, т.к. возможна стимуляция опухолевого роста под влиянием препаратов из грибов р. *Cordyceps*.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ-ПРОДУЦЕНТЫ ПРОМЫШЛЕННО ЦЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Айзенберг В.Л.¹, Стойко В.И.¹, Капичон А.П.¹, Борисенко А.В.², Омельчук Е.А.², Иванов А.А.², Твердохлиб И.А.², Бурбан А.Ф.³, Коновалова В.В.³

1 – Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины

2 – Национальный университет пищевых технологий

3 – Национальный университет «Киево-Могилянская Академия»

Киев, Украина

Создание грибных биотехнологий связано с использованием активных конкурентоспособных микроорганизмов, синтезирующих биологически активные вещества. Поиск новых природных штаммов микромицетов-продуцентов ферментов промышленного значения – важнейшая биотехнологическая задача. В отделе физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАНУ селекционированы технологичные культуры грибов, способных к образованию внеклеточных гидролитических ферментов: эндо-глюканазы (Сх - фермента), инулиназы, липазы, пектинэстеразы. Как известно, при скрининге продуцентов гидролаз уделяют внимание термотолерантным организмам, образующим, как правило, термостабильные ферменты. Проведение промышленной биоконверсии растительного сырья при повышенной температуре энергетически выгодно и снижает риск инфицирования реакционной среды.

Эндо-бета-1,4-глюканазы (КФ 3.2.1.4) катализируют неупорядоченное расщепление целлюлозных молекул на крупные фрагменты, осуществляя глубокий гидролиз целлюлозы. Наиболее высокие показатели эндоглюканазной активности на средах с целлюлозосодержащими материалами получены при выращивании мезофильных культур, относящихся к родам *Aspergillus* и *Penicillium*, а также термотолерантных штаммов, принадлежащих к неопisanному в литературе ранее роду *Corynascus*. Грибы, активные по эндоглюканазе, перспективны при использовании для биоконверсии целлюлозосодержащего растительного сырья.

Изучены морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства селекционированных штаммов *Penicillium sp. 225* *Aspergillus sp.8TX* – продуцентов внеклеточной инулиназы (КФ 3.2.1.7), гидролизующей полифруктозид инулин с образованием фруктозы. Штаммы грибов могут быть использованы в процессе предобработки нетрадиционного сельскохозяйственного сырья (топинамбура, цикория) для получения сахаристых веществ, этанола и др.

Получен новый термотолерантный штамм гриба *Rhizopus sp. 2000 ФМ* - активный продуцент внеклеточной липазы – триацилглицеролгидролазы (КФ 3.1.1.3). Оптимизирован состав питательной среды для культивирования гриба. Изучены физико-химические параметры новой экзолипазы, характеризующейся щелочестойкостью и высокой гидролитической способностью. Штамм найдет применение в бытовой химии, в фармацевтической отрасли промышленности, в косметике, в пищевой и легкой промышленных отраслях, в медицине, в сельском хозяйстве и животноводстве.

Изучены условия культивирования селекционированного в отделе гриба *Penicillium dierckxii (Penicillium fellutanum) 57699* – продуцента пектинэстеразы (ПЭ). ПЭ-гидролаза эфиров карбоновых кислот (КФ 3.1.1.11) – катализирует гидролиз сложноэфирных связей пектиновых веществ с образованием деметоксилированной полигалактуроновой кислоты и метилового спирта. Разработана технологическая схема получения ферментного препарата ПЭ. Совместно с институтом Винограда и Вина (ИвиВ) «Магарач» (Ялта, Крым) впервые установлена возможность использования ПЭ из *Penicillium dierckxii* на стадии деметоксилирования сырья для получения яблочного пектина. Полученный низкометоксилированный пектин обладает детоксицирующими свойствами, имеет

высокую комплексообразующую способность, что позволяет рекомендовать данную биотехнологию для производства продуктов лечебно-профилактического назначения.

БИОСИНТЕЗ ПОЛИАЦЕТИЛЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Алиева С.Р., Велиев М.Г., Исмаилов Э.И., Ягубова Г.Г., Мурадов П.З.

Институт микробиологии НАН Азербайджана

Баку, Азербайджан

Первые природные органические соединения с тройными связями были открыты еще в прошлом столетии. На сегодняшний день изучено множество ацетиленовых метаболитов, полученных из растений, грибов, морских организмов и т.д. Изучение природных ацетиленовых соединений, в особенности синтезированных базидиальными грибами, имеет как особый теоретический, так и значительный практический интерес, вследствие их биологической активности и лечебных свойств. Обладая активностью в широком диапазоне действия, полиацетиленовые соединения даже в ничтожно малых количествах подавляют рост патогенных бактерий.

В связи с широким распространением базидиальных грибов на территории Азербайджана, целью настоящей работы являлось изучение биосинтеза полиацетиленовых соединений базидиальными грибами. В работе использовались грибы следующих видов: *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hirsuta*, *Laetiporus sulphureus*, обнаруженные в лесах различных экологических зон Азербайджана. Грибы выращивались методом глубинного культивирования. Для роста грибов использовалась глюкозо-пептоновая среда. Образовавшуюся через неделю биомассу грибов, измельчали и экстрагировали этиловым эфиром уксусной кислоты. Химический состав полученного экстракта изучали методом тонкослойной хроматографии. В результате проведенного анализа в составе экстракта было показано содержание смеси полиацетиленовых соединений с различным числом углеродных атомов и функциональных групп на концах цепи. Для установления химической структуры каждого из полученных соединений осуществлялась ИК и ЯМР спектроскопия. Было установлено наличие в экстракте следующих высоконепредельных ди- и триацетиленовых монокарбоновых кислот (I-III):

I. Цис-ундека-3-ене-5, 7, 10-трииновая кислота;

II. Цис-ундека-3, 9, 10-триен-5, 7-дииновая кислота;

III. Цис-нона-4-ене-6, 8-дииновая кислота.

Все обнаруженные природные грибные полиацетилены имеют неразветвленную углеродную цепь с 2 – 3 тройными связями и от 1 – 3 двойных связей. Количество атомов углерода в них колебалось от 6 до 14. В силу своей ненасыщенности полиацетилены являются веществами весьма неустойчивыми. Выделенные полиацетиленовые соединения содержат высоконепредельные фрагменты, которые являются весьма реакционноспособными и могут быть использованы в тонком органическом синтезе. В дальнейших наших исследованиях будет изучен более широкий спектр соединений, синтезируемых данной группой грибов.

Таким образом, полученные результаты подтверждают наличие биологически активных соединений в исследованных базидиальных грибах, открывая возможность их дальнейшего применения для получения биологических препаратов, которые могут быть использованы в медицине.

ОТБОР КУЛЬТУР БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ *CORIOLOUS ZONATUS* (*TRAMETES ZONATUS*) НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Антоненко Л.А., Клечак И.Р., Нишпорская О.И.

*Национальный технический университет Украины
Киев, Украина*

Во многих странах мира, таких как Япония, США, Германия, Франция, Россия, высшие базидиальные грибы рассматривают как ценное сырьё для получения биологически активных веществ, которые используются при создании лечебно-профилактических и лекарственных препаратов широкого спектра действия. Для разработки грибных биотехнологий для рода *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.) актуальными являются, во-первых, выбор перспективных культур и поиск питательных сред, которые более ярко могли бы раскрыть биологические и ростовые свойства культур, во-вторых, исследование таких факторов, как влияние условий культивирования и состава питательной среды на биологические и ростовые свойства культур.

Целью нашей работы было изучение способности к росту на жидких средах различного состава грибов вида *Coriolus zonatus*, отбор штаммов, имеющих высокий прирост биомассы, и питательных сред, которые обеспечивали бы наибольшее накопление их биомассы. Исследовали 13 штаммов *C.zonatus*, культивирование проводилось в стационарных условиях в течение 7 суток, при температуре 28 °С. Спектр использованных сред включал природные среды (пивное сусло, молочная сыворотка), комплексные (глюкозо-пептонная, глюкозо-аммонийная, картофельно-глюкозная, среда Норкранс с отваром дубовой коры) и синтетическую среду Норкранс (контроль). Отбор культур осуществлялся по накоплению биомассы и экономическому коэффициенту роста.

Определены штаммовые отличия в накоплении биомассы культурами *C.zonatus* на разных по составу средах. Следует отметить, что на комплексной глюкозо-пептонной среде 8 из 13 штаммов *C.zonatus* продемонстрировали наибольшие значения концентрации биомассы (2,84-9,47 г/л). Самый большой прирост биомассы был отмечен на глюкозо-пептонной среде и на молочной сыворотке. На глюкозо-пептонной среде для штамма 5302 этот показатель составлял 9,47±0,32 г/л, а для 301 - 6,85±0,11 г/л, что соответственно в 50 и 27 раз больше, чем в контроле. У остальных культур на исследованных средах накопление биомассы не превышало 3,5 г/л.

Экономические коэффициенты на глюкозо-пептонной среде составляют для выбранных нами штаммов 301 и 5302 соответственно 37% и 39%. Эти значения находятся почти на таком же уровне, как для *Pleurotus ostreatus* (37%) при росте на минеральной среде с глюкозой и 1% кукурузным экстрактом.

Среди исследованных нами семи питательных сред наименее интересные результаты отмечены на глюкозо-аммонийной и среде Норкранс с отваром дубовой коры, так как они обеспечивали наименьший прирост биомассы (менее 1 г/л).

Что касается природных сред, то небольшие их количества могут быть использованы в роли ростовых факторов к оптимизированной стандартной синтетической среде, поскольку пивное сусло богато органическими соединениями азота, а молочная сыворотка содержит в своем составе аминокислоты, лактозу, витамины и минеральные вещества. Использовать же природные среды как основу для дальнейшей оптимизации нецелесообразно, так как, во-первых, эти среды более подвержены контаминации, во-вторых, стоимость пивного сусла увеличивается; в-третьих, в молочной сыворотке после автоклавирования выпадает осадок, что затрудняет анализ результатов накопления биомассы.

Принимая во внимание все выше сказанное, нами предложено для оптимизации сред для накопления биомассы штаммами *C.zonatus* 5302 и 301 использовать глюкозо-пептонную среду.

ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОРБЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Бабицкая В.Г.¹, Трухоновец В.В.², Пучкова Т.А.¹, Щерба В.В.¹, Иконникова Н.В.¹, Филимонова Т.В.¹, Осадчая О.В.¹

1 – Институт микробиологии НАН Беларуси,

2 – Институт леса НАН Беларуси

Минск - Гомель

Благодаря исследованиям последних десятилетий стало известно, что грибы являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ: белков, липидов, полисахаридов, органических кислот, ферментов, витаминов и др. Многие из этих соединений – фармакологически активные и, по сравнению с продуктами химического синтеза, менее токсичны и более эффективны при применении в медицинской практике.

Для исследований были взяты плодовые тела 2-х штаммов гриба *Ganoderma lucidum* и плодовые тела гриба *Schizophyllum commune*.

В плодовых телах *G. lucidum* белок составил 22-24% (штамм 334) и 22-25% (штамм 335), содержание липидов – 4,5-5,0% (шт.334) и 4,0-4,5% (шт.335). Фосфолипиды в липидах достигали 18-21% и 38-45% соответственно, фенольные соединения – 1500-1800 мг% и 1400-1500 мг%. Антиоксидантная активность – 80-88%. Сумма ненасыщенных кислот в липидах гриба составила 82,80 (шт.334) и 83,75 (шт.335). Содержание линолевой C_{18:2} кислоты – 58,8-68,5%. В плодовых телах *S. commune* белок достигал 20-23%, липиды – 3,0-3,2%, фосфолипиды в липидах – 20,0-25,8%, фенольные соединения – 750-850 мг%, антиоксидантная активность – 85-90 %. Анализ жирнокислотного состава липидов гриба показал, что сумма ненасыщенных жирных кислот составила 76-80%, насыщенных 20,2-24,0%. Характерной особенностью липидов плодовых тел *S. commune* явилось значительное количество в их составе незаменимой линоленовой C_{18:3} кислоты. Оба гриба содержат до 10-20% полисахаридов.

Важной характеристикой грибов является стабильность основных показателей при естественном хранении. Нами показано, что хранение грибов при комнатной температуре в течение 15-19 месяцев не приводит к изменениям их основных биохимических показателей. Интерес к грибам возрастает и в связи с тем, что они обладают высоким сорбционным потенциалом. Основной структурой грибов, обеспечивающей сорбцию, является клеточная стенка, содержащая значительное количество хитина, микрофибрилярное строение которого создает огромную сорбционную поверхность. Изучение способности плодовых тел грибов извлекать медь из растворов показало наличие сорбционных свойств как у *S. commune*, так и у *G. lucidum*. Сорбционная активность мицелия *G. lucidum* 335 и *G. lucidum* 334 по отношению к ионам меди была более высокой и составила 1,11 мг/г и 1,24 мг/г, у *S. commune* – 0,69 мг/г что сравнимо с аналогичными показателями, установленными для широко используемого лигнинового энтеросорбента «Полифепан». Исследуемые грибы были проверены на способность связывать ионы свинца и кадмия, которые по своей токсичности входят в число поллютантов, наиболее опасных для здоровья человека. Из проверенных грибов лучшим сорбентом свинца и кадмия оказался гриб *G. lucidum*.

Важная характеристика энтеросорбентов (грибов) – их способность связывать токсические соединения (эндотоксины), которыми чаще всего являются низкомолекулярные органические соединения. При изучении сорбционной активности по отношению к эндотоксинам используются различные вещества – маркеры, наиболее часто – краситель метиленовый голубой. Оценка сорбционной активности грибов по метиленовому голубому показала, что по данному показателю как *S. commune*, так и *G. lucidum* превосходят известный лигниновый сорбент «Полифепан». Плодовые тела этих грибов превосходят «Полифепан» и по сорбции свинца и кадмия.

Полученные результаты указывают на перспективность использования грибов р. *Ganoderma* и *Schizophyllum* для получения препаратов функционального и лечебно-профилактического действия.

ОБРАЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОЛОВ ЕСТЕСТВЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ *ASPERGILLUS TERREUS*

Баранова Н.А., Крейер В.Г., Пискункова Н.Ф., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Егоров Н.С.

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии
Москва

Мицелиальные грибы *Aspergillus terreus* характеризуются большой морфологической изменчивостью. Отдельные изоляты отличаются структурой и окраской колоний, а также интенсивностью спорообразования. Колонии могут быть бархатистыми или «клочковатыми». Окраска варьирует от коричневой (цвета корицы) до золотисто-желтой или лимонно-желтой.

Билай В.И. и Коваль Э.З. выделяют два варианта *A. terreus*: *A. terreus* var. *africanus* и *A. terreus* var. *aureus* (Билай В.И., Коваль Э.З., 1988).

Естественные варианты *A. terreus* отличаются не только по морфологическим признакам, но и по биосинтетической активности.

Микромицет *A. terreus* представляет интерес в связи со способностью синтезировать из ацетатных единиц низкомолекулярные циклические соединения – статины, в частности, мевинолин (ловастатин) – ингибитор ключевого фермента биосинтеза холестерина 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (КФ 1.1.1.34) (Alberts A.W., Kuron J., Hunt V. et al., 1980).

Некоторые статины, в частности, ловастатин и правастатин (производные компактина) – природные статины грибного происхождения; симвастатин – полусинтетическое производное ловастатина; аторвастатин и флювастатин – синтетические статины в настоящее время широко используются в медицинской практике для лечения и профилактики атеросклероза.

Способность к образованию ингибиторов биосинтеза стеролов была изучена у четырех штаммов *A. terreus*, отличающихся по морфологическим признакам и биосинтетической активности. *A. terreus* шт. 35-6 и *A. terreus* шт.35-7 образуют на сусло-агаре вельветовые светло-бежевые колонии со слабым спорообразованием. *A. terreus* шт.2 на среде Чапека образует светло-коричневые колонии с продольными бороздками. На сусло-агаре колонии плоские, центр приподнят, цвет колоний светло-коричневый, спорообразование обильное. *A. terreus* шт.4 на среде Чапека образует светло-бежевые колонии. На сусло-агаре колонии плоские, светло-коричневые.

При выращивании в глубинных условиях, в среде с глюкозой (3%), глицерином (7%) и мясным экстрактом *A. terreus* шт. 35-6 и *A. terreus* шт.35-7 выделяют в среду вещества, окрашенные в охристые и желтые цвета. *A. terreus* шт.2 и *A. terreus* шт.4 выделяют в среду незначительное количество окрашенных веществ.

Вторичные метаболиты, образуемые исследуемыми штаммами *A. terreus*, были выделены из фильтрата культуральной жидкости и разделены на отдельные фракции методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» в системе хлороформ:ацетон (10:1). Была определена способность отдельных фракций ингибировать рост дрожжей *Rhodotorula rubra* ВКПМ У 1337 и образование ими эргостерина.

Было установлено, что все исследованные штаммы *A. terreus* образуют вещество с Rf, близким к Rf ловастатина, обладающее ингибиторной активностью. Максимальная ингибиторная активность была обнаружена у штамма *A. terreus* шт.4.

Проведен спектрофотометрический анализ выделенных ингибиторов биосинтеза эргостерина в ультрафиолетовой области спектра и было показано, что спектр выделенных веществ идентичен спектру ловастатина.

ПРОБЛЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ МИКОГЕРБИЦИДОВ

Берестецкий А.О., Сокорнова С.В.

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН,
Санкт-Петербург, Пушкин*

Фитопатогенные микромицеты являются основной группой микроорганизмов, ограничивающих численность растений в природе, поскольку обладают способностью к активному распространению и проникновению в ткани хозяев. Большой интерес вызывает их использование для биологической борьбы с нежелательной растительностью (сорные и инвазионные виды растений, продуценты наркотических соединений). В настоящее время поиск и первичная оценка различных патогенов сорных растений стали систематическими и значительное внимание стало уделяться разработке способов получения и хранения микогербицидов. Несмотря на это, в мире для коммерческого применения зарегистрировано не более 10 биопрепаратов для борьбы с сорными растениями. Ограничения, связанные с разработкой коммерчески успешных микогербицидов, в основном, биологические и технологические: мицелиальные грибы, как правило, не спороносят при глубинном культивировании, плохо переносят процессы стабилизации (например, сушки), патогенность грибов находится в сильной зависимости от внешних условий. В докладе будут рассмотрены проблемы выбора типа инфекционного материала, способа его получения и оценки его качества, а также различные препаративные формы микогербицидов. В качестве примера будут приведены результаты наших исследований по разработке биопрепарата на основе некоторых видов грибов против бодяка полевого.

СРАВНЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА КОМПЛЕКСОВ ЦИКЛОСПОРИНА, ПРОДУЦИРУЕМЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *TOLYPOCLADIUM*

Бибикова М.В.¹, Спиридонова И.А.¹, Даниленко А.Н.², Дарханова Т.А.¹, Катлинский А.В.³

1 – ГНЦ по антибиотикам

2 – Институт Биохимической физики имени М. Эмануэля

3 – Московская Медицинская Академии имени М.И.Сеченова
Москва

Циклоспорин А (ЦА) широко используется при пересадке органов и тканей, при лечении ряда аутоиммунных заболеваний. Показана способность ЦА ингибировать множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Проводятся работы по созданию аналогов циклоспорина и изучению их биологической активности.

К настоящему времени описано 30 различных аналогов циклоспоринов. Большинство штаммов продуцируют комплексы, в которых циклоспорин А составляет 40-50%, С - 20-30%, В – 10-15%. Остальные циклоспорины находятся в следовых количествах. Штамм *Tolyposcladium inflatum* subsp.*blastosporum* 2223 использованный для разработки отечественной биотехнологии получения циклоспорина А образует комплекс, в котором ЦА составляет 65-70%.

Исследование образования циклоспоринов различными штаммами представляет биотехнологический, экологический и таксономический интерес. Биотехнологический – поиск аналогов циклоспорина с новыми биологическими свойствами, экологический – распространение энтомопатогенных грибных культур в разных регионах. Имеется предложение использовать оценку образования циклоспоринов и бавериолидов для таксономического разделения штаммов родов *Tolyposcladium*, *Beauveria* и *Paecilomyces*.

Располагая различными штаммами рода *Tolyposcladium*, выделенными из разных регионов РФ, нами была оценена их способность к продукции циклоспоринов и был охарактеризован компонентный состав различных комплексов циклоспоринов.

В работе были исследованы штамм №2, выделенный из почвы Бурятии, штаммы №70, 77, 79, 80, выделенные из почвы Тебердинского заповедника, штамм № 15 из почвы Тверской области. Культуры выращивали в условиях, разработанных ранее в ГНЦА для биосинтеза циклоспорина. В этих условиях все исследованные штаммы проявляли способность к продукции циклоспорина. По литературным данным большинство продуцентов образуют комплексы, в которых ЦА составляет 40-50%, ЦС 20-30%, ЦВ – 10-15%. Штамм 2223 образует комплекс, в котором ЦА составляет 65-70%. Штамм 15 из Тверской области продуцировал комплекс в котором ЦА составлял 45%. Штаммы 77 и 80 из Теберды продуцировали комплексы, в которых ЦА составлял 80-85%. Интерес представляет штамм 79, продуцирующий только ЦА. Штамм №2 продуцирует комплекс, в котором содержание ЦА (55-60%) соответствует большинству описанных продуцентов, содержание циклоспорина В является значительно более высоким, а содержание циклоспорина С очень низким. Представляет интерес заметное количество циклоспорина (Leu 4)Cs. Это соединение проявляет выраженную активность в отношении вируса HIV1.

Таким образом, представленные данные подтверждают, что образование комплекса циклоспоринов является существенным признаком при определении таксономического положения грибов рода *Tolyposcladium*. Изучение компонентного состава продуцируемого комплекса позволило выявить наличие компонента (Leu4)Cs, у которого описана высокая активность в отношении вируса HIV1, в связи с чем данная культура может явиться основой для дальнейших генетико-селекционных и биотехнологических исследований.

ДИЕТИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ СЕРИИ «МИКО» - НОВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ.

Бисько Н.А.¹, Джуренко Н.И.², Паламарчук Е.П.²

1 – Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины

2 – Национальный ботанический сад имени Н. М. Гришко

Киев, Украина

Согласно оценке экспертов ВОЗ здоровье человека на 8-12% зависит от системы здравоохранения, на 18-20% - от генетической предрасположенности человека к тому или иному заболеванию и на 68-74% определяется способом жизни, наиболее важной составляющей которой является питание.

Недостаточное и несбалансированное питание, связанное с дефицитом полноценного белка, витаминов и микроэлементов, вызывает развитие и рост заболеваний обмена веществ, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, онкологических и других болезней, приводит к снижению работоспособности, уменьшению продолжительности жизни.

Установлено, что многие виды грибов из классов Basidiomycetes и Ascomycetes имеют в своем составе все незаменимые для человека аминокислоты, высокое содержание ценных ненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, витаминов, клетчатки, разнообразных биологически активных соединений, обладают лекарственными и лечебно-профилактическими свойствами - способствуют укреплению иммунной системы, снижению содержания холестерина, оказывают антибактериальное, антифунгальное, противовирусное действие, для них характерны радиопротекторная и антиоксидантная активность.

Основными компонентами диетических добавок серии «Мико» являются 20 видов ценных лекарственных грибов, таких как *Ganoderma lucidum*, *G.applanatum*, *Lentinus edodes*, *Hericium erinaceum*, *Piptoporus betulinus*, *Cordyceps sinensis* и другие. Лечебно-профилактические свойства этих видов грибов обусловлены входящими в их состав различными биологически активными соединениями – полисахаридами разной структуры, терпенами, полипропиленовыми кислотами, полифенолами и другими. В состав этой серии диетических добавок входят также 13 видов растений – гинкго билоба, топинамбур, тыква, лимонник китайский, левзея сафлоровидная и другие, которые характеризуются высоким содержанием минеральных элементов, витаминов, пектинов, разнообразных биологически активных веществ (инулин, ликопин и т.д.).

Серия «Мико» представлена 33 диетическими добавками, отличающимися по компонентному составу грибов и растений. Разработка технологии оптимизации состава добавок за счет варьирования видов растений и грибов, а также их количественного соотношения позволила получить диетические добавки направленного действия – для повышения иммунитета, выведения из организма токсических веществ, улучшения работы печени, нормализации обмена веществ, увеличения работоспособности, а также обладающие другими ценными лечебно-профилактическими свойствами. Диетические добавки в себя представляют собой сублимированный криопорошок и выпускаются в виде таблеток, капсул, пакетиков с порошком для заваривания.

Государственную санитарно-эпидемиологическую экспертизу диетические добавки серии «Мико» проходили в Институте гигиены и медицинской экологии им.А.Н.Марзеева Академии Медицинских Наук Украины.

ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ШТАММОВ *C. ALBICANS*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Блинкова Л.П., Горбатко Е.С.

ГУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН

Москва

Для создания профилактических и диагностических препаратов важным биотехнологическим этапом является получение биомассы, которую в максимальном количестве можно получить при оптимально подобранной системе «штамм – питательная среда».

Целью работы являлся поиск штаммов *C. albicans*, наиболее продуктивных по выходу биомассы на трофически адекватных им питательных средах.

Выбор питательной среды, оптимальной для высокопродуктивного штамма *C. albicans*, проведен нами с 10 штаммами (клинические штаммы №1 – №9, эталонный штамм *C. albicans* ATCC 885-653), выращенных на 10 жидких питательных средах традиционных и оригинальных рецептур. Кроме питательного бульона, триптиназо-соевого бульона, среды Тодда-Хьюитта, среды Верфель-Фергюссона, среды LB, в экспериментах испытывали сконструированные нами среды СПАС-4а (соево-казеиновая) и СПАС-2б (соево-пептонная), ГЛБ (казеиново-дрожжевая), солевые среды СС-1 и ML.

Выращивание штаммов проводили в течение 22±2 час в условиях периодического культивирования с применением 18-часовой посевной культуры, стандартизованной до 500 млн. клеток /мл.

Необходимо отметить, что предварительное культивирование указанных штаммов *C. albicans* на жидкой среде Сабуро в течение 22±2 час показало, в основном, статистически равноценную конечную концентрацию клеток у изученных клинических штаммов *C. albicans* и эталонного штамма. При этом максимальный средний показатель оптической плотности суспензий (ОП) отмечен у штаммов №3 и №8. Для дальнейших экспериментов был выбран штамм *C. albicans* №8.

Результаты сравнительного периодического культивирования штаммов *C. albicans* свидетельствовали, что штамм №8 имел наиболее высокий выход биомассы на всех средах. Так, на средах СПАС 4а и СПАС-2б с соевым компонентом оптическая плотность суспензий штамма №8 после выращивания имела наибольшую величину (ОП 1,8 – 2,2).

Несколько ниже была конечная концентрация на среде ГЛБ (ОП 1,7) и среде Верфеля-Фергюссона (ОП 1,1).

Примерно одинаковым (ОП от 0,8 до 1,0) был выход биомассы на средах LB, Тодда-Хьюитта, триптиназо-соевом бульоне, на питательном бульоне.

На безбелковых средах СС-1 и ML величина оптической плотности клеточной суспензии *C. albicans* в конце культивирования зафиксирована на уровне 0,7 и 1,4, соответственно.

Таким образом, для получения биомассы выбранного высокопродуктивного штамма *C. albicans* №8, который предлагается использовать в качестве основы профилактических и диагностических препаратов, наиболее пригодны полноценные питательные среды серии СПАС или солевая среда ML.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Борзова Н.В., Варбанец Л.Д.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
Киев, Украина

Современные биотехнологические компании уделяют большое внимание разработке и внедрению новых ферментов для использования в различных медико-технологических процессах. Перспективной группой являются О-гликозил-гидролазы, способные катализировать гидролиз О-гликозидных связей в гликозидах, олиго-, полисахаридах, гликолипидах и других гликоконъюгатах. Эти ферменты принимают участие в целом ряде ключевых метаболических процессов, а их характерной особенностью является абсолютная специфичность относительно конфигурации расщепляемой связи. К таким ферментам относятся и α -галактозидаза и α -N-ацетилгалактозаминидаза, которые характеризуются высокой специфичностью по отношению к терминальным остаткам α -D-галактозы и α -N-ацетилгалактозамина, что позволяет использовать их как в качестве инструментов структурных исследований, а также, что особенно важно, в разработке новейших биотехнологических процессов и медицине.

Нами разработаны методы получения грибных α -галактозидазы и α -N-ацетилгалактозаминидазы из культуральной жидкости микромицетов *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* и *Penicillium canescens*. В результате очистки грибных ферментных препаратов путем фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации и анионообменной хроматографии на TSK-гелях с последующей рехроматографией на сефарозе 6В было получено три препарата α -галактозидазы (294, 24 и 25 Е/мг) и один препарат α -N-ацетилгалактозаминидазы (10,5 Е/мг). Молекулярная масса всех ферментов составляла порядка 400 кДа, результаты электрофореза в ПААГ позволяют предположить тетрамерную структуру молекул α -галактозидаз *A. niger*, *C. cladosporioides* и *P. canescens*. Все препараты показали высокую термо- и рН-стабильность и устойчивость при хранении на протяжении более 5 лет. Термостабильность препаратов может быть обусловлена высоким содержанием гидрофобных аминокислот (около 30 %) и присутствием углеводного компонента (14, 9 (манноза, рамноза, арабиноза, глюкозамин) и 10 % (манноза, галактоза, глюкозамин)). α -Галактозидаза *C. cladosporioides* характеризовалась широкой субстратной специфичностью как по отношению к гликону, так и к типу связи, с наибольшим сродством к α -1,2- и α -1,6-связанной галактозе, фермент *P. canescens* проявлял наибольшее сродство к α -1,3-связанной галактозе и расщеплял разветвленный трисахарид Gal \square 1,3(Fuc \square 1,2)Gal, который является группоспецифической детерминантой эритроцитов крови группы В(III). α -Галактозидаза *A. niger* проявляла узкую специфичность не только по отношению к гликону, но также и к агликону, действуя только на синтетические галактозилные субстраты. Изученные гликозидазы являются металлонеинdependantными, в их активном центре присутствует карбоксильная группа С-концевой аминокислоты и имидазольная группа гистидина. В поддержании активной конформации молекулы фермента принимают участие сульфгидрильные группы. Было показано, что культуры грибов-продуцентов непатогенны, а препараты ферментов нетоксичны.

Полученные результаты предполагают различные области возможного практического применения α -галактозидазы и α -N-ацетилгалактозаминидазы микромицетов. Эти ферменты могут быть использованы для биотрансформации эритроцитов крови групп А(II) и В(III) в унифицированные эритроциты О-типа, в энзимотерапии болезней человека (болезни Шиндлера и Фабри), которые обусловлены наследственным отсутствием синтеза этих гликозидаз, следствием чего является нарушение гликопротеинового обмена. Использование α -галактозидазы в ксенотрансплантации позволяет подавлять реакции антиген-антитело путем инактивации α -галактозных гликотопов. Также в последние годы

выявлено присутствие α -галактозных и α -N-ацетилгалактозаминных эпитопов у вируса иммунодефицита человека, что открывает перспективы использования вышеуказанных ферментов при разработке тест-систем для диагностики СПИДа.

СТРАТЕГИЯ ОТБОРА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ШТАММОВ МАКРОМИЦЕТОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

Бухало А.С., Михайлова О.Б., Поединок Н.Л.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины

Киев, Украина

Для успешного проведения фундаментальных и прикладных исследований культур макромицетов с лекарственными свойствами очень важным фактором является наличие специализированной коллекции культур, на базе которой ведется скрининг штаммов по морфолого-физиологическим характеристикам. В Коллекции культур Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины поддерживается около 300 видов (более 1000 штаммов) базидиальных и сумчатых грибов, представляющих таксономическое и экологическое биоразнообразие. Около 100 штаммов депонированы в Коллекции как объекты патентования (продуценты плодовых тел, биомассы, лечебно-профилактических пищевых добавок, ферментов, фармакологических препаратов). Большинство культур были получены авторами в разные годы из ткани или спорового материала плодовых тел собранных в природе, на территории Украины, стран СНГ, Западной Европы, Израиля, США, Индии и др. (Бухало и др. 2006) Особое внимание в Коллекции уделяется точной идентификации культур на видовом уровне, установлению важнейших экологических факторов, обеспечивающих поддержание жизнеспособности и биосинтетической активности при длительном хранении культур.

При установлении таксономического положения культур грибов должны быть использованы следующие критерии: наличие и морфология стадии телеоморфы; морфология и скорость роста мицелиальной колонии на эталонной среде; наличие и тип конидиального спороношения; наличие, расположение и морфология пряжек (для базидиомицетов) и других структур вегетативного мицелия; ферментативные реакции (тесты) грибной колонии; температурный интервал роста мицелия (особенно верхний предел). Исследования с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) позволили нам получить новые данные о морфологии культур около 150 видов лекарственных грибов. Полученные результаты изложены в подготовленной авторами монографии по микроструктурам вегетативного мицелия в культурах базидиальных и сумчатых макромицетов. Монография (в печати) включает атлас микроструктур 100 видов. Важной характеристикой при отборе штаммов-продуцентов является радиальная скорость роста на агаризованных средах. В Коллекции проведен отбор продуцентов плодовых тел, биомассы, лечебно-профилактических пищевых добавок, биологически активных веществ в т.ч. имеющих лечебное действие. Это штаммы видов *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. eryngii* (DC.) Gillet, *Morchella esculenta* (L.) Pers., *M. conica* Pers., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *G. applanatum* (Pers.:Wallr.) Pat., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Agaricus blazei* Murrill, *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow и др. (Buchalo et al., 2002; Бухало и др. 2004). В результате отбора культур в разных условиях освещения установлено положительное влияние облучения синим и красным светом на прорастание спор, рост мицелия, формирование склероциев и плодовых тел, сокращение сроков культивирования. В процессе отбора биотехнологически перспективных штаммов важно установить корреляцию между определенными морфологическими, физиологическими, биохимическими характеристиками культур и желаемыми свойствами продуцентов. Так, например: формированию плодовых тел у сморчков предшествует стадия образования склероциев: наличие сильной реакции на лакказу в мицелиальной колонии гериция шиповатого может коррелировать с таким нежелательным явлением, как побурение карпофоров. В каждом конкретном случае поисковая программа скрининга продуцентов включает в себя исследование в чистых культурах макромицетов ферментов, антибиотиков, полисахаридов, пигментов, подбора оптимальных значений pH, источников углерода,

азота, минералов, витаминов, биостимуляторов и др. для обеспечения наилучшего роста мицелия, образования плодовых тел или продуктов метаболизма.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ФЕРМЕНТА – ЛАККАЗЫ ИЗ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП

Ветчинкина Е.П., Степанова Л.В., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Саратов

Ксилотрофные базидиомицеты *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (шиитаке) и *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray (миитаке) во всем мире ценятся как высококачественные съедобные грибы и продуценты уникального комплекса биологически активных и лекарственных веществ, нашедших широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности. Данные представители двух порядков базидиальных гименомицетов относятся к грибам белой гнили и входят в экогруппу лигнинразрушающих ксилотрофов, способных, благодаря наличию активных окислительных ферментов, полностью разрушать все компоненты древесины. Трутовик *G. frondosa* (*Aphyllorphorales*) с экологических позиций является паразитом, крайне редко переходя к сапротрофному типу питания. Как правило, гриб поражает старые или ослабленные деревья, достаточно быстро разлагая субстрат. *L. edodes* (*Agaricales*), напротив, является сапротрофом и может колонизировать деревья достаточно долгое время, не вызывая их гибели.

К ключевым оксидазам истинно дереворазрушающих грибов относятся лакказы. Эти ферменты, благодаря широкой субстратной специфичности и, как следствие, способности катализировать окисление широкого круга органических (в первую очередь ароматических) и неорганических соединений, представляют большой интерес как для фундаментальных исследований, так и для практического использования в различных областях биотехнологии.

В ходе наших исследований по способности грибов окислять субстраты фенолоксидаз: АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)), диметоксифенол и сиригальдазин, мы установили наличие у обеих культур на стадии дикариотического мицелия активных лакказ. Ферментативную активность определяли спектрофотометрически, в результате чего было установлено, что окислительная способность данных оксидаз грифолы превосходит таковую шиитаке в 7 раз. Это свидетельствует о более мощной окислительной системе трутовика, приспособленного к паразитическому существованию, направленной на быстрое разложение субстрата.

Для выделения и очистки лакказ использовали 18-и суточный дикариотический мицелий *L. edodes* и *G. frondosa*, в которых был отмечен максимум ферментативной активности. Очистку проводили методом гель-фильтрации фосфатно-солевым буфером на колонке с Sephadex G-75 (Sigma, США) с помощью детектора «Uvicord S II» (LKB, Швеция) при $\lambda = 280$ нм. Дальнейшую очистку белковых фракций, обладающих активностью лакказы, проводили на анионообменной колонке Toyopearl DEAE-650M (Tosoh, Япония), элюцию белков осуществляли градиентом соли NaCl (от 0 до 1 М). Получили несколько пиков, два из которых, в случае базидиомицета *L. edodes*, обладали активностью лакказы ($23,2 \text{ мкМ/мин}^{-1}/\text{мг}^{-1}$ и $6,4 \text{ мкМ/мин}^{-1}/\text{мг}^{-1}$) и элюировались с колонки при значении элюента 0,2 М и 0,3 М NaCl соответственно. В случае гриба *G. frondosa*, фракцию, выходящую с колонки при 0,5 М NaCl, идентифицировали как лакказу с активностью фермента $161,7 \text{ мкМ/мин}^{-1}/\text{мг}^{-1}$.

По результатам электрофореза в неденатурирующих условиях, специфического окрашивания на активность лакказы и окраски нитратом серебра одна лакказа шиитаке имела молекулярную массу около 110 кДа, а другая около 80 кДа. Лакказа трутовика имела приблизительную молекулярную массу 66 кДа.

Таким образом, наше исследование показало, что существует различие по активности лакказ у ксилотрофных базидиомицетов представителей паразитического и

сапротрофного образа существования. Трутовик *G. frondosa* синтезирует в несколько раз более активные лакказы, которые, в связи с этим, могут найти широкое применение в различных биотехнологических процессах.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ГРИБЫ РОДА ПОЛИПОРУС (POLYPORUS P. MICHELI EX ADANS, POLYPORACEAE S.L.) НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Власенко В.А., Власенко А.В., Анькова Т.В., Косогова Т.А., Теплякова Т.В.

Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН

ФГУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора

Новосибирск – п. Кольцово, Новосибирская обл.

На юге Западной Сибири выявлено 14 видов рода *Polyporus* P. Micheli ex Adans., из которых 7 видов являются лекарственными и встречаются в Новосибирской области. Полипорусы развиваются преимущественно на древесине лиственных пород, относятся к экологической группе мезофилов и входят в состав различных растительных ассоциаций. Полипорусы содержат биологически активные соединения, проявляющие антиопухолевый, диуретический, гепатопротективный, антиоксидантный, иммуностимулирующий, противовирусный, антибактериальный эффект. Препараты из лекарственных грибов могут использоваться как биологически активные добавки и являться комплексным дополнением к традиционным лекарственным препаратам, не имеют противопоказаний. Используются как плодовые тела грибов, так и вытяжки из мицелиальной культуры. Некоторые виды культивируют. Так в Китае, выращивают *P. umbellatus*, получая урожай 2 кг грибов с площади 70 / 70 / 50 см и экспортируют сухое вещество. Перспективным является введение данных грибов в культуру и дальнейшее изучение их лекарственных свойств. Биологически активные компоненты и лекарственная активность грибов рода полипорус: *P. arcularius* (Batsch) Fr. – продуцирует изодрименедиол, многочисленные сесквитерпены и изокрипториновую кислоту, проявляет антибактериальную активность к *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, экстракт полисахаридов мицелиальной культуры – антиопухолевую активность. *P. brumalis* (Pers.) Fr. – экстракт полисахаридов мицелиальной культуры проявляет антиопухолевую активность. *P. badius* (Pers.) Schwein. – содержит липополисахарид CD 14+, экстракт мицелиальной культуры задерживает развитие грмм отрицательных бактерий и связывают их эндотоксины, разрушающие клетки млекопитающих, проявляет иммуномодулирующую активность. *P. leptcephalus* (Jacq.) Fr. – экстракт полисахаридов мицелиальной культуры проявляет антиопухолевую активность. *P. squamosus* (Huds.) Fr. – проявляет антибактериальную активность. *P. tuberaster* (Jacq.) Fr. – содержит эргостерол, в народной медицине используют при лихорадке. *P. umbellatus* (Pers.) Fr. – содержит эргон, биотин, полипорестерон А и полипорестерон В. Используется в народной медицине как широко применяемое лекарственное средство при бели, желтухе, отеках, урологических нарушениях, для лечения пиелонефритов, нефритов и мочекаменной болезни и для их предотвращения, обладает также анти-альдостеронным диуретическим эффектом. Проявляет противоопухолевый эффект, инъекции полисахаридов рекомендуется ставить в дополнение к химиотерапии и лучевой терапии при раке печени и легких, при лейкозах. Эргон (ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one), производная часть эргостерола, эффективен в борьбе с раковыми клетками у людей. Проявляет высокий цитотоксический эффект против желудочной карциномы и в меньшей степени против рака толстой кишки. Полисахариды *P. umbellatus* связывают белок сдерживающий питание и поглощение воды (toxohormone-L), который стимулирует анорексию у больных раком, таким образом препятствуя появлению общей атрофии. Полипорестерон А и полипорестерон В проявляют антиоксидантный и антигемолитический эффект, защищая клетки крови от разрушения под действием свободных радикалов, образующихся при распаде пищи. Полисахариды *P. umbellatus* активируют иммунную систему, улучшают клеточный иммунитет. Проявляет противовирусную активность к Гепатиту В, обладает ингибирующей активностью к *Chlamydia trachomatis*, вызывающему хламидиоз, к простейшему *Plasmodium falciparum*,

который является причиной болезни малярии, а также к *Brucella* spp., вызывающему бруцеллез.

**БИОГУМИФИКАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ
ЛИГНИНРАЗРУШАЮЩИМ КОМПЛЕКСОМ МИКРОМИЦЕТОВ РОДОВ
TRICHODERMA, PENICILLIUM, ASPERGILLUS
И БАКТЕРИЙ РОДОВ *BACILLUS, FLAVOBACTERIUM, PSEUDOMONAS***

Воробьев Н.И., Свиридова О.В.

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии
Санкт-Петербург*

Для эффективной деструкции лигноцеллюлозных субстратов необходимо объединение микромицетов, актиномицетов и бактерий в специальную трофическую цепь микроорганизмов (ТЦМ), в которой может осуществляться их взаимная энергетическая поддержка и разложение субстрата по заданной схеме. В естественных почвенных условиях вероятность образования ТЦМ чрезвычайно мала. Нами предлагается искусственная организация почвенных микробиологических процессов, направленная на синтез гумуса. Это дополнительно может улучшить санитарно-экологическую ситуацию в почвах, так как потенциальная патогенная микрофлора будет отвлечена на деструкцию растительных остатков.

Были проведены экспериментально-теоретические исследования (ГРАФ-анализ) для определения роли и места микромицетов и бактерий в ТЦМ при биогумификации растительных остатков различного генезиса (опилки и кора хвойных деревьев, древесина плодовых деревьев, солома зерновых культур). В нашей работе исследовались ТЦМ, содержащие микромицеты родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* (*T. viride* Pers., *P. chrysogenum* Thom., *P. albocinerascens* Maubl., *A.niger* v. Tieghem, *F. oxysporum* Schlecht Snyder et Hans) и бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cellulosomonas*.

Для искусственного формирования ТЦМ введен специальный технологический этап: инокуляции растительных остатков в лабораторных условиях. После этого этапа субстратно-микробиологический комплекс помещается в почву. Мы полагаем, что это способствует трансмиссии гумификационной функции комплекса на почвенный биоценоз, и аборигенная микрофлора оказываются также задействованной в соответствующих процессах. В результате был выбран наиболее эффективный лигнинразрушающий комплекс микроорганизмов (биогумификатор БАРКОН). Было обнаружено, что этот биогумификатор обладал дополнительным свойством - снижением токсического действия лигноцеллюлозных субстратов на растения.

Кроме этого, мы вели поиск такого комплекса микроорганизмов, который способен привлекать патогенные и непатогенные микромицеты почв в гумификационную деятельность по разложению лигноцеллюлозных органических субстратов. Это позволяет одновременно решить две задачи. С одной стороны, большинство почвенных микроорганизмов оказываются занятыми в гумификации растительных остатков, и этим повышается почвенное плодородие. С другой стороны, эти микроорганизмы, выполняя общую гумификационную функцию, не смогут переключиться на другую деятельность, в том числе, и на биологическую атаку здоровых растительных и животных организмов.

Опыты с применением данной технологии и биопрепарата проводились в Ленинградской, Московской и Владимирской областях в течение пяти лет. Они демонстрируют повышение гумусового фона почв и снижение уровня грибных заболеваний зерновых культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Гашникова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н.

ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

п. Кольцово Новосибирской обл.

Несмотря на большое количество разработанных в настоящее время анти-ВИЧ препаратов, существует проблема эффективности применяемой противовирусной терапии. Основные причины, препятствующие решению этой проблемы, это токсичность препаратов, их высокая стоимость и свойство ВИЧ-1 вырабатывать к ним устойчивость. Поэтому крайне актуальной остается проблема разработки эффективных и недорогих противовирусных средств, не обладающих токсическим действием на организм человека. Исследование противовирусной активности экстрактов базидиальных грибов проводилось на перевиваемой линии лимфоцитов человека МТ-4. Анти-ВИЧ активность экстрактов из грибов оценивали по подавлению накопления вирусного белка р24 в инфицированных клетках с использованием его количественного определения методом иммуноферментного анализа. Подавление прироста вирусспецифического белка р24 различными разведениями исследуемых экстрактов оценивалось как при их одновременном внесении с вирусом (инактивация вируса), так и после адсорбции вируса (лечебное действие). Всего в 3-х сериях экспериментов было исследовано 13 образцов базидиальных грибов из различных систематических групп. В таблице представлены сводные данные по ингибированию репродукции ВИЧ-1 (по р24).

Ингибирование репродукции ВИЧ-1 экстрактами базидиальных грибов

№ п/п	Род грибов	Исследуемый штамм № образца	Нетоксичное разведение для 100% клеток	При одновременном внесении с вирусом		При внесении после адсорбции	
				50%*	100%*	50%*	100%*
1	<i>Pleurotus</i>	07-09	1:640	1:6400	1:400	1:3200	1:800
		07-10	1:320	1:3200	1:400	1:3200	1:800
		07-12	1:320	1:3200	1:400	—	—
		08-04	1:640	1:800	1:400	—	—
2	<i>Lentinus</i>	08-06	1:640	1:3200	1:400	1:1600	1:800
		52	1:80	1:6400	1:800	1:3200	1:1600
3	<i>Ganoderma</i>	07-03	1:640	1:640	1:1280	1:640	1:80
4	<i>Laetiporus</i>	08-09	1:640	1:800	1:400	—	—
5	<i>Inonotus</i>	07-05	1:640	1:6400	1:3200	1:3200	1:3200
		07-45	1:320	1:64000	1:16000	1:16000	1:8000
		08-08	1:100	1:64000	1:16000	1:64000	1:16000
		08-10	1:320	1:12800	1:6400	1:6400	1:3200
6	<i>Volvariella</i>	07-34	1:80	1:320	1:160	1:80	—

* - процент подавления прироста вирусспецифического белка р24 различными разведениями исследуемых препаратов

Исследования показали, что достаточно высокий антивирусный эффект в отношении ВИЧ-1 имеют штаммы грибов из родов *Inonotus*, *Lentinus* и *Pleurotus*, куда относятся и такие съедобные грибы, как шиитаке (*Lentinus edodes*) и вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*).

БИОСИНЕРГЕТИКИ – БИОРЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА ШИРОКОГО ДЕЙСТВИЯ.

Григораш А.И., Воробьева Г.И., Кудрявцев А.Е., Лоенко Н.Н., Погорельская Л.В., Бредихина Н.А.

ООО «Гелла-Фарма»,

ФГУП ГосНИИсинтезбелок

Москва

Нарушение микробиоценоза - актуальная проблема сегодняшнего дня. Не смотря на большой арсенал различных лекарственных средств, более 90% населения в той или иной степени страдают дисбактериозом. Причиной, по-видимому, является рассмотрение микробиоценоза отдельно от целостной открытой саморегулирующейся (диссипативной) системы, которой является организм. Соответственно, попытки решить проблемы дисбактериоза однонаправленными средствами, без воздействия на сопряженные системы гомеостаза, неубедительны и неустойчивы.

Для восстановления микробиоценоза и коррекции дисбактериоза кишечника в частности, в арсенале специалиста должны быть комбинации различных относительно однонаправленных средств. Профессионализм специалиста в этом случае состоит в адекватном подборе сочетаний лекарственных средств, способных оказывать сбалансированное и согласованное действие на сопряженные системы гомеостаза. Следовательно, подобная комбинация средств должна обладать синергетически взаимообусловленными свойствами. Решение такой задачи представляет чрезвычайную трудность. С такими проблемами гораздо успешней должны справляться природные биорегуляторы, состав которых многокомпонентен, сбалансирован по концентрациям и синергетически взаимосвязан.

«Флоравит» - природный биорегулятор на основе грибной субстанции, который кроме воздействия на микрофлору кишечника, обладает гепатопротекторными, иммуномодулирующими, адаптогенными свойствами и т.д. «Флоравит» представляет собой композицию биологически активных веществ, продуцируемых мицелиальным грибом *Fusarium Sambucinum*. Учитывая сложный состав и биологическую роль каждой из составляющих препаратов «Флоравит» можно говорить о синергетическом взаимодействии всех компонентов и интегральных эффектах применения препаратов «Флоравит»: антиоксидантная активность, мембраностабилизирующий эффект; улучшение микроциркуляции; противовоспалительный эффект; купирование цитолитического синдрома - нормализация уровня АСТ, АЛТ при вирусных и токсических гепатитах; коррекция углеводного и жирового обмена веществ; нормализация процессов регенерации; дезинтоксикационный эффект; нормализация различных звеньев иммунитета и интерфероногенеза; восстановление адаптогенной активности; восстановление репродуктивного потенциала. Клинические исследования и более чем 10-летний опыт применения препаратов «Флоравит» в коррекции микробиоценоза показали эффективность и стабильный результат.

Подобные многоплановые природные биорегуляторы, способные одновременно и сбалансировано воздействовать на несколько систем гомеостаза, представляется целесообразным выделить в отдельную группу – биосинергетики. Биологическую активность этих препаратов целесообразно определять не столько по составу и концентрациям компонентов, сколько сбалансированностью и синергетической взаимосвязанностью составляющих, что проявляется гармоничным воздействием на организм. Сбалансированность композиции обеспечивается «круговой причинностью» продуцируемых в процессе культивирования компонентов. Стандартизировать полученные препараты возможно по показателям «параметров порядка», характеризующих биотехнологию производства субстанции с высокой биологической активностью. Для препаратов «Флоравит» параметрами порядка являются: количество

суммы полисахаридов ($P_c = 40$ мг/100г), суммы незаменимых аминокислот ($A_c = 281$ мг/100г), $pH = 4$, коэффициент редукции ($K_r = 8-10$). Для других биосинергетиков параметрами порядка могут выступать другие характерные сочетания компонентов.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ОКСИЛИПИНОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Гроза Н.В., Иванов И.В., Мягкова Г.И.

МГА тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова
Москва

Окисленные производные ненасыщенных жирных кислот (оксипирины) играют важную роль в процессах адгезии, роста и репродукции клеток грибов [Tsitsigiannis D.I., 2004]. Несмотря на прогресс в области исследования оксипиринов, остаются невыясненными особенности взаимодействия болезнетворных грибов с животными тканями, поэтому актуальной задачей является изучение метаболизма оксипиринов в грибах, их участия в передаче клеточных сигналов, возможности их взаимодействия с ферментами окисления липидов организма-хозяина.

В связи с тем, что моногидро(перокси)тетраеновые жирные кислоты (Н(Р)ЕТЕ) наряду с собственной биологической активностью являются предшественниками целой серии продуктов метаболизма каскада окисления арахидоновой кислоты (липоксенов, лейкотриенов, гепоксилинов), изучение роли их аналогов грибного происхождения (3-гидроксилипинов) представляет наибольший интерес. 3-Гидроксиполиеновые кислоты были обнаружены как продукты трансформации экзогенных жирных кислот в некоторых видах грибов (*D. uniuucleata*, *C. albicans*, *M. genevensis*) [Deva R., 2000]. Для изучения биологической активности 3-гидрокси-тетраеновых кислот (3-НЕТЕ) были проведены исследования их ферментативной трансформации с применением липоксигеназ (LOX): 15-LOX, 12-LOX, 5-LOX. 3-НЕТЕ содержит систему *цис*-двойных связей арахидоновой кислоты и, таким образом, является хорошим субстратом для LOX. Продукты ферментативной реакции – дигидроксиполиеновые кислоты – были выделены при помощи этилацетатной экстракции и проанализированы с использованием ВЭЖХ на обращенной и хиральной фазах, а также GC-MS-спектрометрии. При окислении 3-НЕТЕ при помощи 15-LOX и 12-LOX наблюдали образование 3,15- и 3,12-DiHEHE соответственно. В результате ферментативной реакции 3-НЕТЕ с 5-LOX наряду с продуктом 3,5-DiHEHE, соответствующим продукту окисления арахидоновой кислоты, была образована 3,11-DiHEHE, причем соотношение данных соединений было 1:3. Такой эффект можно объяснить тем, что 3-гидроксигруппа, находясь близко к пятому углеродному атому жирной кислоты, создает пространственные затруднения при взаимодействии 5-LOX с субстратом 3-НЕТЕ, и происходит изменение ориентации субстрата в активном центре фермента, что и приводит к преимущественному образованию 3,11-DiHEHE.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ШТАММА БАЗИДИОМИЦЕТА
TYV-2006 *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (WILL.) BONDARTSEV ET SINGER
Громовых Т.И., Ковалева Г.К., Садыкова В.С., Айрапетова А.Ю.**

Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Сибирский государственный технологический университет

Пятигорская государственная фармацевтическая академия
Москва – Красноярск - Пятигорск

Базидиомицетовые грибы стали интересовать микологов и биотехнологов как источник получения ряда высокоэффективных веществ с противоопухолевой активностью, антибиотиков, психотропных и антиспидовых препаратов.

Трутовик лекарственный, или листовенничная губка – *Fomitopsis officinalis* (Will.) Bond. et Singer, привлекает в настоящее время внимание фармацевтов и биотехнологов как объект, проявляющий противотуберкулезное, седативное, кровоостанавливающее действие, благотворно влияющий на легкие и желудок, а также успешно используемый и в парфюмерной промышленности как антиперспирант. Однако биологически активные вещества трутовика лекарственного изучали в базидиомах, формирующихся в природных условиях на древесных растениях. Исследований по оценке биохимического состава вегетативного мицелия гриба, получаемого путем жидкофазного и твердофазного культивирования, крайне мало. Работу проводили со штаммом Tyv-2006 (ВКПМ F-961) *Fomitopsis officinalis*, выделенным в 2006 г. из многолетнего плодового тела гриба.

Проведена оценка показателей роста нового штамма базидиомицета Tyv-2006 *Fomitopsis officinalis* при культивировании на твердых и жидких питательных средах. Результаты исследований роста штамма Tyv-2006 *F. officinalis* на агаризованных средах показали, что гриб является медленнорастущим. Продуктивность по биомассе повышается путем обогащения питательной среды листовенничными опилками.

Большое значение для характеристики нового штамма как продуцента биологически активных веществ имеет сравнительная оценка биохимического состава мицелия и плодового тела. Оценка биохимического состава плодовых тел *F. officinalis* показана в работах У.С. Ооржак и В.М. Ушановой. Исследования биохимического состава мицелия *F. officinalis* до настоящего времени не проводились. Установлено, что биохимический состав, как плодовых тел, так и мицелия гриба *F. officinalis* характеризуется невысоким содержанием белков, углеводов и неорганических веществ. Различен состав водорастворимых веществ в мицелии и плодовом теле: суммарный выход экстрактивных веществ из плодового тела составляет 3,59 %, из мицелия – 40,96 %.

Доля общего белка в мицелии составляет 16,50 %, тогда как в плодовом теле в 10 раз меньше (1,53 %). В общих фракциях аминокислот мицелия преобладает тирозин, изолейцин и лейцин, входящие в группу незаменимых аминокислот. В незначительных количествах присутствуют лизин, треонин и валин. Тогда как в плодовых телах преобладают тирозин, треонин, валин и лейцин. Отсутствует триптофан, который содержится в плодовых телах и мицелии многих базидиомицетов.

Важное место среди биологически активных веществ занимают липиды, причем их ценность тем выше, чем больше в их составе важных в биологическом отношении фосфолипидов. Суммарное содержание липидов в мицелии – 7,47 %, тогда как в плодовом теле – 29,29 %. Фосфолипиды в мицелии составляют 3,89 % и 1,72 % в плодовом теле. В липидных фракциях мицелия и плодовых тел обнаружена агарициновая кислота, которая является биологически активным соединением.

Исследования на мышах показали, что водные экстракты, полученные из мицелия штамма Tyv-2006 *Fomitopsis officinalis* и плодовых тел, нетоксичны. При внутрибрюшинном введении изучаемого гриба опытные животные имели достоверно не различающиеся показатели роста, веса и поведения в сравнении с контрольной группой.

ПОДХОДЫ К ПОИСКУ НОВЫХ ВИДОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Дьяков М.Ю.

Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва

В связи с бурным развитием методической базы биотехнологии и молекулярной биологии в последние десятилетия появилась реальная возможность введения в производственную практику новых видов организмов с теми или иными ценными свойствами. Это во многом справедливо по отношению к базидиальным макромицетам. К ним относится порядка 10 000 видов. Реально активно используются в настоящее время небольшое количество видов. Тем не менее, эта группа грибов является неисчерпаемым источником ценнейших соединений для самых разных сфер человеческой деятельности. Приведём несколько примеров: — ферменты, разрушающие растительные фенолсодержащие полимеры для выведения контаминантов из природных экосистем, для текстильной промышленности и т.п.; — соединения с иммуностимулирующей и антиоксидантной активностью; — соединения с антибиотическими свойствами; — витамины, незаменимые аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты и другие соединения, полезные для здоровья и профилактики заболеваний.

С этой точки зрения такая огромная группа видов, как базидиальные макромицеты практически не изучена. Большинство крупных коллекций культур микроорганизмов изначально были предназначены для хранения культур бактерий, несовершенных грибов и актиномицетов. Одна из крупнейших коллекций культур грибов в России, работающая с высшими базидиальными грибами (Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН) содержит штаммы, принадлежащие приблизительно 500 видам, что, конечно не охватывает всего разнообразия этой группы. Более того, методы получения фертильных плодовых тел в искусственных контролируемых условиях разработаны лишь для очень ограниченного количества видов. Как правило, это либо виды, используемые в грибоводстве (роды *Agaricus* и *Pleurotus*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velupes* и др.) и медицине (*Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* и др.) практике либо модельные объекты научных исследований, например, *Coprinus cinereus*, *Schizophyllum commune*.

На кафедре микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова ведутся работы с базидиальными макромицетами. Основными направлениями этих исследований — изучение экологических аспектов у грибов в природных экосистемах и работы по генетике, цитологии, физиологии и морфогенезу. В последние годы мы начали осуществление новой программы по изучению базидиальных макромицетов в плане выявления новых видов и штаммов, перспективных для разных направлений биотехнологии (фармакология, пищевая промышленность и т.п.).

С этой целью положено начало новой коллекции, состоящей из культур, изолированных тканевым и полиспоровым методом из различных регионов России (Москва и Московская область, Ростовская область, Краснодарский край). К настоящему моменту коллекция насчитывает 44 штамма, принадлежащие 36 видам, из разных таксономических и эколого-трофических групп. Основное внимание уделялось ксилотрофным грибам (16 видов) и подстилочным сапротрофам (12 видов). Это обусловлено относительной близкими требованиями грибов данной экологической специализации к условиям культивирования. Проводятся работы по изучению морфолого-культуральных признаков, ультраструктуры мицелия, особенностей жизненных циклов и других аспектов биологии этих видов и штаммов. Особое внимание уделяется отработке методов получения фертильных плодовых тел, что даёт возможность осуществить в искусственных условиях полный цикл развития. Для каждого вида подбирается своя рецептура субстрата и условия культивирования. Исследуются особенности морфогенеза.

Работа проводится при поддержке гранта РФФИ № 08-04-00492-а.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1.17 И *P. ADAMETZII* ЛФ F-2044.1.18 – ПРОДУЦЕНТОВ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Жуковская Л.А., Михайлова Р.В., Хомич М.Б., Семашко Т.В.

ГНУ Институт микробиологии НАН Беларуси

Минск

Глюкозооксидаза (ГО) (α -D-глюкозо: O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) – ФАД-содержащий фермент, относящийся к семейству GMC (глюкозо-метанол-холин) оксидоредуктаз. ГО катализирует окисление α -D-глюкозы до α -D-глюконолактона и пероксида водорода. Фермент широко используется в медицине, пищевой и химической промышленности.

В лаборатории ферментов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» отобран продуцент ГО – *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1. Из ДНК данного гриба выделен и охарактеризован ген *gox*, кодирующий фермент, сконструированы векторы для экспрессии гена *gox* и при помощи метода электропорации получены *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, характеризующиеся повышенным в 2,0-2,5 раза уровнем образования ГО.

Цель работы – дать морфологическую характеристику рекомбинантных штаммов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18.

Изучение морфологии колоний полученных рекомбинантных штаммов проводили в течение 12 мес, используя цитологический метод с последующим анализом особенностей роста грибов на наборе агаризованных питательных сред (Чапека, Райстрика, сусло-агаре и сусло-агаре с 1,5% NaCl).

Установлено, что колонии *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 круглые, выпуклые, мицелий пушистый, реверзум белый. На среде Чапека колонии гриба белого цвета с центральной зоной, окрашенной в зеленый цвет, на среде Райстрика – белые с радиальной складчатостью и желтым поверхностным экссудатом, на сусло-агаре и сусло-агаре с 1,5% NaCl – зеленые с белой краевой зоной. Что касается *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, то, колонии гриба круглые, выпуклые, мицелий пушистый, реверзум белый. На среде Чапека колонии белого цвета с центральной зоной светло-зеленого цвета, на среде Райстрика – белые с радиальной складчатостью и желтым поверхностным экссудатом, на сусло-агаре – желто-зеленые с белым краем, а на сусло-агаре с 1,5% NaCl – светло-зеленые с белым краем.

Выявлено различие в скорости роста рекомбинантных штаммов, выращенных на испытанных средах. Линейная скорость роста исследуемых штаммов составила на средах Чапека и сусло-агаре – 3,17 и 3,15, 3,23 и 3,20 мм/сут соответственно, на среде Райстрика – 4,12 и 4,09 мм/сут. Максимальная скорость роста грибов (4,7 и 4,5 мм/сут) отмечена при росте на сусло-агаре с добавлением 1,5% NaCl. Установлено, что рекомбинантные штаммы в отличие от исходного штамма *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 характеризуются снижением линейной скорости роста колоний на 0,2-0,91 мм/сут.

Показано, что *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 на протяжении 12 мес (7 генераций) был стабилен по морфологическим признакам, а *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 расщеплялся на 3 морфологических варианта, образующих следующие колонии: зеленые с белой краевой зоной (1), светло-зеленые с белой краевой зоной и желтым экссудатом (2), белые (3).

ПЦР анализ морфологических вариантов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 показал, что варианты, с белой окраской колоний, утрачивают встроенный ген *gox* в процессе хранения.

Полученные результаты позволяют рекомендовать *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 – стабильный и высокоактивный по синтезу ГО штамм в качестве продуцента фермента.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS* В ПТИЦЕВОДСТВЕ.

Зинина Н.В., Буйко Н.В., Щерба В.В.

Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышеселеского

Институт микробиологии НАН Беларуси,

Минск

К микробным продуцентам липофильных биоантиоксидантов можно отнести и базидиальный гриб *Laetiporus sulphureus*, являющийся продуцентом не только каротиноидов – ксантофиллов, но и ряда биоактивных соединений липидной природы - фосфолипидов, полиеновых жирных кислот, витаминов, стероидов и др.

Целью данных исследований явилось определение биологической эффективности препарата на основе липокаротиноидного комплекса гриба *Laetiporus sulphureus* для использования в промышленном птицеводстве.

Материалы и методы исследований. Эффективность препарата изучали на цыплятах-бройлерах кросса «Росс» в возрасте 10 суток. Препарат смешивали с кормом и скармливали в течение 30 суток путем свободного доступа цыплят к корму. Доза препарата составляла 1,4 г на 1 кг корма. Биологическую эффективность препарата изучали на фоне оксидантного стресса, индуцированного скармливанием окисленного жира в расчете 30 г на 1 кг корма (3%). Жир был подвергнут окислению под УФ-облучением до перекисного числа – не менее 0,6 % йода. Для проведения опыта были сформированы 4 группы цыплят по 10 голов в каждой. Цыплята первой опытной группы получала окисленный корм с добавлением препарата, цыплята второй опытной группы получали окисленный корм без добавления препарата; цыплята третьей опытной группы – обычный рацион (ОР) с добавлением препарата. Четвертая группа служила контролем и получала ОР. Иммунологические свойства препарата изучали после иммунизации вакцинным штаммом вируса болезни Ньюкасла. Вакцинации подвергались все группы птиц в 12-суточном возрасте. Титры антител изучали на 14-е сутки после вакцинации. Показатель интенсивности перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид (МДА)) определяли в сыворотке и в тканях печени и мозга. МДА определяли реакцией с 2-тиобарбитуровой кислотой, МДА в биоматериале по методике И. Д. Стальной, Т. Г. Таршвили (1977). Напряженность поствакцинального иммунитета к вирусу болезни Ньюкасла определяли в РЗГА (согласно указаний ГУВ МСХ СССР от 18.05.1979г

Результаты исследования. Профилактическая доза препарата, соответствующая 1,4г на кг корма, стимулирует рост и развитие цыплят-бройлеров.

Усвояемость каротиноидов организмом птиц из препарата определяли путем измерения каротина в сыворотке крови. При введении препарата концентрация каротина в сыворотке крови цыплят 1-й и 3-й опытных групп превышала данные контрольной группы на 30-й день опыта в два и более раз.

Препарат оказывает позитивное влияние на показатели, характеризующие интенсивность перекисного окисления липидов у цыплят-бройлеров, проявилось в снижении продукта липопероксидации – малонового диальдегида (МДА). В группах, где применялся препарат, содержание МДА было значительно меньше, чем в группе, где скармливался окисленный жир без препарата (2-я опытная группа). Кроме того, в этой группе зарегистрированы патологоанатомические изменения в печени, характерные для токсической дистрофии, у 90 % цыплят, в то время, как в опытных группах заболевание не отмечено.

Проведение реакции задержки гемагглютинации эритроцитов сывороткой крови, полученной от бройлеров, вакцинированных вирусом болезни Ньюкасла, выявили высокую иммуностимулирующую активность препарата. Во всех группах титры антител больше $4\log_2$. Если сравнивать данные 1-й опытной группы со 2-й, то мы увидим, что применение препарата в 1-й группе совместно с окисленным жиром привело к

увеличению титра антител на $1,5\log_2$ по сравнению со 2-й группой, где в рацион вводили окисленный жир без использования препарата. То же мы видим, сравнивая данные 3-й опытной группы и контрольной, добавка препарата повышала величину титров антител на $1,8\log_2$. Следует отметить, что в значительно большей степени повышение было отмечено в группе птиц, потреблявших неокисленный жир. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии препарата на иммунную систему птиц, подверженных действию липидиндуцированного оксидантного стресса.

ПРОБЛЕМА НАКОПЛЕНИЯ РАДИОНУКЛИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИМИ ГРИБАМИ, ИСПОЛЬЗУЮЩИМИСЯ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Иванов А.И., Скобанев А.В., Плотников М.А.

ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА»

РЦГЭКиМ по Пензенской области

Пензенский государственный университет

Пенза

В настоящее время внимание медиков все больше привлекают дереворазрушающие грибы как продуценты биологически активных веществ. В связи с этим возникает вопрос об экологическом контроле заготавливаемого грибного сырья для фармакологических целей, так как практически все лесные экосистемы европейской части России испытывают в той или иной степени техногенное загрязнение. Среди дикорастущих лекарственных грибов в наибольших объемах заготавливается чага (*Inonotus obliquus*). Как показали наши исследования, места его развития оказываются приуроченными к участкам леса, где под воздействием техногенного загрязнения ослабляется иммунный статус древесных растений (виды рода *Betula*). Исследования проводились на территории Пензенской области. Анализ грибов на содержание тяжелых металлов осуществлялся рентгенофлуоресцентным методом на спектрометре «Спектроскан Макс-GF1E». Измерение активности радионуклидов проводилось на гамма-спектрометрическом комплексе СКС-50М. По каждому виду анализировалось не менее трех образцов.

Исследования показали, что на территориях, которые попали в полосу выпадения радиоактивных осадков в результате аварии на Чернобыльской АЭС, среднее содержание ^{137}Cs в плодовых телах чаги составляет 296 ± 21 Бк/кг, при 14 ± 1 Бк/кг в субстрате. Также довольно велико среднее значение удельной активности ^{241}Am - 201 ± 19 Бк/кг в плодовых телах (230 ± 19 Бк/кг в субстрате). Его наличие связано с последствиями ядерных взрывов в атмосфере в период с 1945 по 1982 годы. Помимо этого чага накапливает естественные радионуклиды: ^{40}K - 348 ± 29 Бк/кг в плодовых телах при 168 ± 18 Бк/кг в субстрате и ^{226}Ra - 123 ± 11 Бк/кг и 79 ± 6 Бк/кг соответственно.

В последнее время, внимание фармакологов привлекают виды рода *Trametes*, которые служат сырьем для получения ряда биологически активных добавок на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета «ТРАМЕЛАН», «ФЛОРАЛИДА ЦТ» и др. (Горшина, 2005, Брагинцева, 2005). По содержанию радионуклидов они не выделяются, по сравнению с их содержанием в других дереворазрушающих грибах. В отношении биоабсорбции тяжелых металлов и мышьяка у этих грибов существует определенная видовая специфичность. В ходе исследований был изучен характер накопления тяжелых металлов и мышьяка в плодовых телах следующих видов: *Trametes gibbosa*, *T. hirsuta* и *T. versicolor*. Так, *T. versicolor* накапливает максимальное количество железа - 880,63 мг/кг. Базидиомы *T. gibbosa* имеют наибольшее содержание цинка - 52,24 мг/кг. Содержание никеля в плодовых телах грибов рода *Trametes* колеблется слабо, и составляет от 3,07 до 5,00 мг/кг. В настоящее время не существует нормативов, регламентирующих содержание тяжелых металлов, мышьяка и радионуклидов в плодовых телах ксилотрофных макромицетов, используемых в качестве сырья для приготовления БАВ. Представленные здесь результаты химического и радиологического анализа базидиом ксилотрофных грибов показывают их потенциальную опасность при использовании в фармакологических целях.

СПОСОБ ХРАНЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ КУЛЬТУР МИКРОМИЦЕТОВ

Ильин Д.Ю., Лихачев А.Н.

ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА»,

МГУ имени М.В. Ломоносова

Пенза – Москва

Одной из приоритетных задач в прикладной микологии является также разработка режимов для хранения чистых культур грибов, а также рецептур питательных сред, позволяющих предотвратить изменения их физиолого-биохимических свойств. Как правило, промышленные и лабораторные регламенты ограничивают время хранения периодом 4-6 месяцев. При этом необходима разработка регламента критериев по оценке сохранения свойств культур.

Нами в течение значительного периода исследований изучены возможности сохранения ценных качеств штаммов-продуцентов антибиотиков, принадлежащих к видам *Penicillium chrysogenum* Thom, *P. nigricans* (Bainier) Thom, *Fusidium coccineum* Fuckel, *Acremonium chrysogenum* (Thirum. & Sukapure) W. Gams а также штаммов *Mortierella alpina* Peyronel, *M. elongata* Linnemann, перспективных продуцентов ненасыщенных жирных кислот и *Trichoderma viride* Persoon, основы получения биопрепаратов. При оценке сроков жизнеспособности культур указанных штаммов использовали высевы суспензий культур и микроскопический контроль препаратов. Признаками старения культур, служит появление хламидоспор, снижение базофилии протоплазмы, увеличение степени вакуолизации, частичный лизис вегетативного мицелия, а сохранение жизнеспособности-численность колоний. Другим приемом контроля состояния культур служит определение продуктов перекисного окисления липидов, которое является интегральным показателем интенсивности оксидантного стресса. Антиоксидантный потенциал культур на разных сроках хранения оценивается также путем количественного определения сульфгидрильных групп при помощи реактива Элмана.

Для увеличения сроков жизнеспособности культур в синтетическую питательную среду для хранения микромицетов (среда Райстрика) вносили раствор селената натрия, чтобы конечная концентрация вещества составила 10^{-4} - 10^{-6} г/л. Этот прием запатентован нами и используется при хранении коллекционных культур (Патент на изобретение №2185435). Результатом внесения данного вещества в питательную среду являются существенная стабилизация культурально-морфологических и биохимических параметров хранящихся культур. Особенно значительная разница в оцениваемых показателях обнаруживается по истечению регламентируемого срока хранения. Это проявляется в замедлении процессов, сопровождающих необратимое старение культур. Кроме того, необходимо отметить, что одновременно со стабилизацией культурально-морфологических показателей, на высоком уровне сохраняется также и физиолого-биохимический потенциал. Так, показатели прорастания спор после хранения на обогащенных селеном средах не изменились за период, равный 6 месяцам у *P. chrysogenum*. Показатели ферментативной активности названного продуцента после длительного хранения культур на обогащенных средах составили в опыте и контроле, соответственно, ЕД/мл: по прошествии 1 месяца – 26090 и 26200; 3 месяцев – 19687 и 23410. После 6 месяцев хранения метаболическая активность продуцента в контроле угасла, а в опыте составила 18180 ЕД/мл, а после 9 месяцев хранения 12320 ЕД/мл.

Хроматографический анализ спектра ненасыщенных жирных кислот мицелия грибов рода *Mortierella* и качественная оценка интенсивности образования липидных перекисей выявили позитивные стороны такого подхода к хранению мицелиальных культур.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *LAETIPORUS SULPHUREUS* (FR.) BOND. ET SING.

Ильина Г.В., Лыков Ю.С., Костычев А.А.

ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА»

Пенза

Одним из представителей базидиальных грибов, пригодных в пищу и способных к синтезу каротиноидных пигментов, участвующих в окислительном обмене и депонировании кислорода в клетках, является *Laetiporus sulphureus* (Гвоздкова и др., 2003). Известны также антимикробные свойства данного вида (Тихонова и др., 2001). В работе О.В. Ефременковой и др. (2006), показано, что антимикробная активность коррелирует с закислением среды до pH 2,5–2,8 и в основном антимикробное действие обеспечивается за счет синтеза мицелием органических кислот. При этом отмечено, что антимикробные спектры были одинаковыми у всех исследованных штаммов *L. sulphureus*. Однако данных об уровне антимикробной активности различных штаммов и факторах, способных ее модифицировать, не приводится.

Нами изучены антимикробные свойства трех штаммов *L. sulphureus*, выделенных из плодовых тел, характеризующихся разной степенью пигментации. Штамм Ah-5 выделен из базидиомы с кремовой поверхностью и бледно-желтым гименофором, Ah-6 – из плодового тела с охряно-желтой поверхностью и желтовато-белым гименофором и штамм Ah-28 – из темно-оранжевой базидиомы с желтым гименофором. Мицелий названных штаммов в условиях поверхностного культивирования также характеризуется разной степенью пигментации, причем интенсивность его окраски изменяется в той же последовательности. Антимикробную активность мицелия изучали при совместном выращивании мицелия штаммов с культурами *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* (среда МПА с добавлением 5% глюкозы), а также методом лунок по Егорову (Егоров, 1994) на агаре, засеянном культурой бактерий способом «газона». Перфорации в агаре (лунки) при помощи стерильной пипетки заполнялись этилацетатными экстрактами глубинного мицелия указанных выше штаммов *L. sulphureus*. Опыты проводились в трехкратной повторности, критерием антимикробной активности штаммов служила величина зоны угнетения роста тест-культур. В результате экспериментов установлено, что при совместном выращивании отмечается формирование четкой разделительной зоны между колониями бактерий и мицелиальных культур изученных штаммов. Ширина разделительных зон варьировала от $3,2 \pm 0,04$ до $5,3 \pm 0,11$ мм, при этом штаммовые отличия находились в пределах ошибки. На этом фоне обнаружено, что антимикробная активность экстрактов глубинного мицелия у разных штаммов неоднозначна. Так, зоны угнетения роста культуры *S. aureus* под действием диффундирующих в агар экстрактов мицелия штаммов Ah-5, Ah-6, Ah-28 составили, мм: $5,11 \pm 0,26$; $6,40 \pm 0,46$ и $9,21 \pm 0,91$ соответственно. Зона угнетения роста культуры *E. coli* экстрактами разных штаммов составила (в том же порядке), мм: $7,11 \pm 0,26$; $9,40 \pm 0,46$ и $11,52 \pm 0,54$ соответственно. Полученные данные свидетельствуют об антимикробной активности штаммов в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Экстракт глубинного мицелия угнетает рост бактерий в более значительной степени, чем экзопродукты поверхностно растущего мицелия, диффундирующие в агар. Причем, в эксперименте с местными штаммами *L. sulphureus* установлена положительная корреляционная зависимость между антимикробной активностью штаммов и пигментацией плодовых тел и мицелия, то есть интенсивностью синтеза каротиноидов. Это также может свидетельствовать о вероятности, возможно даже и косвенной связи продукции метаболитов с антимикробными свойствами и синтеза таких вторичных метаболитов, как каротиноидные пигменты. Данное направление, безусловно, требует проведения дополнительных исследований, подразумевающих расширение спектра как грибных штаммов, так и бактериальных тест-объектов, а также оценку активности

продукта в сравнении с фармакопейными антибиотиками. Кроме того, определенный интерес представляет изучением антисептических свойств культуральной жидкости.

ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕСТРУКЦИИ НЕФТИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

Ильчибакиева¹ Э.У., Автономова² А.В., Марченко¹ М.Ю., Сковородко¹ И.В., Барков¹ А.В. Леонтьева² М.И., Краснопольская² Л.М., Винокуров¹ В.А.

1 – РГУ нефти и газа имени И. М. Губкина

2 – ГУ НИИНА имени Г.Ф.Гаузе РАН

Москва

При ликвидации последствий разливов нефти и нефтепродуктов наряду с механическими и физико-химическими методами очистки почвы традиционно применяют биопрепараты. В качестве основы биопрепаратов для ремедиации нефтезагрязнённых почв чаще применяют бактерии-нефтедеструкторы, реже – грибы, способные к утилизации ксенобиотиков.

Целью настоящей работы явился отбор и изучение штаммов базидиальных грибов, способных к утилизации нефти для дальнейшей разработки биопрепарата.

На первом этапе исследования был проведён скрининг 15 штаммов ксилосапротрофных базидиомицетов, способных развиваться в присутствии нефти. В чашки на стерильный лигноцеллюлозный субстрат тонким слоем наносили сырую нефть таким образом, чтобы площадь пятна составляла $\frac{1}{4}$ поверхности субстрата. Большинство штаммов не проявили способность колонизировать нефть или развивались на ограниченном пространстве нефтяного пятна на границе с лигноцеллюлозным субстратом. Два штамма, принадлежащие к родам *Trametes* и *Fomitopsis*, активно колонизировали пятно, покрыв хорошо развитым воздушным мицелием всю его поверхность.

На следующем этапе исследования была показана способность отобранных штаммов использовать нефть в качестве единственного источника углерода. Далее оценивали снижение содержания нефти в субстрате при культивировании отобранных штаммов. В качестве субстрата использовали как стерильную, так и нестерильную почву, содержащую 5% стерильной нефти. Общее количество нефти в субстрате определяли гравиметрическим способом, используя в качестве растворителя хлороформ. За три недели наблюдения количество нефти, утилизированной штаммом рода *Trametes*, составляло 39% в стерильной и 37% в нестерильной почве, штаммом рода *Fomitopsis* – 22% и 21% соответственно. Грибы развивались не только на поверхности, но по всему объёму нефтезагрязнённого субстрата.

Таким образом, в результате работы были отобраны штаммы ксилосапротрофных базидиомицетов, обладающие нефтеокисляющей активностью и сохраняющие ее в присутствии аборигенной почвенной микробиоты. Отобранные штаммы могут быть использованы в качестве основы препаратов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв.

ОСНОВЫ ГРИБНОЙ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА

Ильчибакиева Э.У.¹, Попова О.В.¹, Бардин М.Е.¹, Барков А.В.¹, Соболева Н.Ю.², Автономова А.В.², Леонтьева М.И.², Краснопольская Л.М.², Винокуров В. А.¹

1 – РГУ нефти и газа имени И. М. Губкина

2 – НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе РАМН

Москва

Разработка технологий производства биотоплива второго поколения связана с поиском новых возобновляемых источников сырья. В настоящей работе изучали возможность использования базидиальных грибов для получения масла, которое возможно использовать в качестве сырья для производства биодизельного топлива.

На первом этапе работы оценивали способность коллекционных штаммов базидиальных ксилотрофных грибов к синтезу липидов. Для выращивания изучаемых штаммов использовали методы погруженного и твердофазного культивирования. Результаты проведенных экспериментов показали, что содержание липидных фракций в вегетативном мицелии изученных штаммов варьирует в пределах от 3% до 14%. Наиболее активные липидообразователи относились к родам *Lentinus*, *Agrocybe*, *Laetiporus*. Для отобранных штаммов были разработаны питательные среды, использование которых позволило повысить содержание липидов в мицелии до 25-53%. Параллельно была отработана лабораторная методика экстракции и очистки липидной фракции мицелия базидиальных грибов.

Отобранные штаммы выращивали в полупромышленном аэрлифтном ферментаторе на разработанных средах. Из выращенной биомассы выделяли липидные фракции и проводили определение их жирнокислотного состава, кислотного и йодного чисел. Результаты показали, что по основным характеристикам, в том числе по жирнокислотному составу, масло базидиальных грибов сходно с соевым маслом.

Образцы грибного масла были использованы для получения метиловых эфиров жирных кислот методом щелочного метанолиза. В результате было показано, что синтезированные таким образом эфиры могут использоваться как заменитель дизельного топлива (биодизель).

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

Кабанов А.С., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Сергеев А.Н.

ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

п. Кольцово Новосибирской области

В настоящее время особую актуальность имеет поиск новых продуцентов препаратов против вируса гриппа, способных оказывать профилактическое и лечебное действие, благодаря выраженной у них противовирусной активности.

Многие виды и штаммы базидиальных грибов являются продуцентами природных соединений, проявляющих противоопухолевую, антибластическую активность, цитостатическое действие и противовирусный эффект.

В данной работе приведены результаты изучения противовирусной эффективности экстрактов грибов из родов *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Laetiporus*, *Inonotus*, *Lentinus* на клеточных культурах MDCK, инфицированных вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) (табл.).

Таблица

Результаты противовирусной активности грибных экстрактов в культуре клеток MDCK, инфицированных разными дозами штамма вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1)

№ образца и его разведение	Разведение ВАЖ, не вызывающее ЦПД в клетках MDCK	Доза вируса, вызывающая ЦПД в клетках MDCK (lgЭИД ₅₀ /100мкл)	Инфекционность вируса (титр ВАЖ) в клетках MDCK (ИД ₅₀ lgТЦД ₅₀ /мл)	Индекс нейтрализации ИД ₅₀ контроль – ИД ₅₀ опыт (lg)
07-09 (1:20)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
07-10 (1:20)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
07-23 (1:5)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
07-48 (1:5)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
08-06 (1:5)	10 ⁻⁴	3,8	4,5	3
08-09 (1:5)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
08-10 (1:5)	10 ⁻⁴	3,8	4,5	3
4 (1:10)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
15-1 (1:5)	10 ⁻⁴	3,8	4,5	3
15-3 (1:5)	10 ⁻⁵	2,8	5,5	2
15-5 (1:10)	10 ⁻²	5,8	2,5	5
Контроль вируса без препарата	10 ⁻⁷	0,8	7,5	

Из таблицы видно, что наиболее значительное подавление инфекционности вируса A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) на культуре клеток MDCK показали следующие образцы. В разных разведениях экстракты 07-09; 07-10; 07-23; 07-48; 08-09; 4, 15-5 подавляли инфекционность вируса гриппа птиц на 5 lg. При разведении 1:5 образцы 08-6; 08-10; 15-1 подавляли инфекционность этого вируса на 3 lg, а образец 15-3, отличающийся от 15-1 способом подготовки, только на 2 lg.

Полученные данные свидетельствуют о перспективе исследования противовирусной активности базидиальных грибов с целью разработки препаратов против вируса гриппа.

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В МИЦЕЛИИ ГРИБА *LENTINUS TIGRINUS* ПРИ ПОГРУЖЕННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Кадималиев Д. А., Паршин А. А., Надежина О. С., Бабилова Т. Е.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева,
Саранск

Лигнолитические грибы “белой гнили”, к которым относится гриб *Lentinus tigrinus*, обладают уникальными свойствами эффективно разлагать растительные отходы и токсичные вещества благодаря выделяющемуся комплексу активных внеклеточных лигнолитических ферментов. В состав этого комплекса входят: лакказы, лигнинпероксидаза, Mn-пероксидаза и секреторная пероксидаза растительного типа, а также H_2O_2 генерирующие ферменты.

Принимая во внимание то, что эти ферменты являются внеклеточными, полагают, что важную роль в процессе их секреции во внешнюю среду играют мембранные структуры, в частности фосфоинозитиды (ФИ), входящие в состав мембранных фосфолипидов (ФЛ).

ФИ, являются структурными компонентами клеточных мембран живых организмов и выполняют целый ряд важных физиологических функций. От соотношения фракций ФИ зависит функциональное состояние мембраны - вязкость, проницаемость. Средство к ионам кальция и метаболическая активность этих фракций значительно различается, поэтому от их соотношения зависит интенсивность образования важных метаболитов вторичных посредников – диацилглицерина (ДАГ) и мио-инозитов. Однако, о составе ФИ и их изменении в процессе роста и развития в клетках микроорганизмов, и, прежде всего лигнолитических грибов известно мало. В связи с этим целью данной работы было изучение процесса изменения состава ФИ и активности фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С (ФИ-ФЛ С) мицелия гриба *L. tigrinus* в процессе роста.

Объектом исследования служил лигнолитический гриб *L. tigrinus*, пилолистник тигровый, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов как штамм ВКМ F-3616 Д. В мицелии этого гриба были обнаружены следующие фракции ФИ: инозитол – 1 - фосфат (ИМФ), инозитол – 1,4 - дифосфат (ИДФ) и инозитол – 1,4,5 - трифосфат (ИТФ). В процессе роста гриба качественный состав ФИ не изменялся, однако наблюдались значительные изменения в их количественном соотношении. Рост гриба сопровождался снижением содержания фракций ИМФ и ИДФ и увеличением содержания фракции ИТФ на протяжении всего периода культивирования. Изменение количественного соотношения ФИ зависело от активности ФИ-ФЛ С. Обнаружена корреляция между максимальной активностью ФИ-ФЛ С и соотношением отдельных фракций ФИ.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что ФИ и их метаболиты играют важную роль в функционировании лигнолитических грибов. Их действие может реализовываться как через участие в радикальных процессах деградации субстратов, так и через изменение состояния мембран мицелия лигнолитических грибов.

РЕЗУЛЬТАТЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО СКРИНИНГА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ АГАРИКОИДНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Кириллов Д.В., Погорельский И.П.

ВНИИОЗ имени проф. Б.М. Житкова

Вятский государственный университет

Киров

Для оценки антибактериальных свойств были отобраны пробы следующих видов грибов: *Amanita muscaria* var. *muscaria* (L.) Lam., *A. citrina* (Schaeff.) Pers., *Inocybe rimosa* (Bull.) P. Kumm., *Coprinus atramentarius* (Bull.) Fr., *C. comatus* (O.F. Müll.) Gray, *C. micaceus* (Bull.) Fr., *Hypholoma marginatum* (Pers.) J. Schröt. и *Boletus edulis* var. *edulis* Bull. У видов рода *Coprinus* в эксперименте исследовали 2 типа плодовых тел: "молодые" – с белыми пластинками и "старые" – зрелые плодовые тела с чернеющими пластинками. В опытах использовали водные экстракты плодовых тел.

Исследование токсического влияния экстракта плодовых тел грибов на микроорганизмы проводили на штаммах бактерий *Bacillus subtilis* (лабораторный штамм) и *Bacillus cereus* 8035 (штамм из Государственной коллекции микроорганизмов ГИСК имени Л.А. Тарасевича, номер штамма ГКПМ 010014). В эксперименте визуально оценивали степень развития колоний тест-штаммов *B. subtilis* и *B. cereus* под бумажным диском, смоченным экстрактом плодовых тел, и на его периферии, отмечали наличие факта ингибирования роста колоний.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1. Можно заключить, что изученные виды обладают разной степенью антибактериальной активности. Наиболее токсичным для бактерий видом оказался *Coprinus atramentarius*. В зоне действия диска, смоченного экстрактом плодовых тел данного вида, а также на его периферии, на расстоянии 2 и 3 мм наблюдалось ингибирование роста культур тест-штаммов *B. subtilis* и *B. cereus* соответственно. Несколько меньший уровень токсичности зафиксирован для плодовых тел *Inocybe rimosa*: зона ингибирования роста культур бактерий составила здесь 1 и 0,5 мм, соответственно. Слабую антибактериальную активность показали также экстракты *Hypholoma marginatum* и *Coprinus comatus*. Экстракты *Amanita muscaria*, *A. citrina* и *Coprinus micaceus* не обладают выраженными токсическими свойствами в отношении используемых в экспериментах штаммов бактерий.

Таблица.

Результаты изучения антибактериальной активности экстрактов плодовых тел исследуемых грибов

Вид	рН экстракта	Антибактериальная активность в отношении	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Boletus edulis</i>	4,9	-	-
<i>Hypholoma marginatum</i>	5,6	±, отдельные стерильные участки	-
<i>Inocybe rimosa</i>	5,1	слабая, стерильная зона 0,1 мм	слабая, стерильная зона 0,5 мм
<i>Coprinus micaceus</i>	6,3	-	-
<i>C. atramentarius</i> , молодые ПТ	5,7	средняя, стерильная зона 2,0 мм	средняя, стерильная зона 3,0 мм
<i>C. comatus</i> , молодые ПТ	6,9	±, отдельные стерильные участки	±, отдельные стерильные участки
<i>C. comatus</i> , старые ПТ	6,8	±, отдельные стерильные участки	±, отдельные стерильные участки
<i>Amanita citrina</i>	5,7	-	-
<i>A. muscaria</i> , шляпки	5,4	-	-

<i>A. muscaria</i> , ножки	5,1	-	-
H ₂ O, контроль	6,8	-	-

Примечание: "-" – не активен, "±" – очень слабая антибактериальная активность.

Выявленная антибактериальная активность плодовых тел *Hypholoma marginatum*, *Inocybe rimosa*, *Coprinus atramentarius* и *C. comatus* показывает перспективность их использования в качестве средств с антисептическим или антибиотическим действием, а также как сырья для получения этих веществ.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА АГАРИЗОВАННЫХ СРЕДАХ

Клечак И.Р., Линовицкая В.М., Дзыгун Л.П., Малюк А.М.

Национальный технический университет Украины
Киев, Украина

Большое внимание к разным аспектам биологии и биосинтетической активности высших дереворазрушающих грибов отдела *Basidiomycota*, наблюдаемое в последние годы, обусловлено, в первую очередь, расширением сферы их практического использования. Получение экологически чистых, физиологически функциональных пищевых продуктов, а также оздоровительных и лечебно-профилактических препаратов является чрезвычайно актуальной проблемой. Исходя из этого, исследование разных видов съедобных грибов, которые по современным данным имеют иммуностимулирующее, антиоксидантное, противоопухолевое, антивирусное и адаптогенное действие заслуживает особого внимания. К грибам, для которых характерны такие свойства, принадлежат и такие высшие базидиомицеты, как *Grifola frondosa*, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus squamosus* и *Schizophyllum commune*. Помимо этого, все эти дереворазрушающие грибы обладают мощным комплексом гидролитических и окислительных ферментов, которые могут быть основой ферментных препаратов, необходимых для разных отраслей промышленности. Основопологающими условиями исследования грибов есть их идентификация и возможность длительного сохранения ценных штаммов в физиологически активном состоянии на агаризованных средах. Одним из относительно легко определяемых штаммовых признаков является наличие активности определенных ферментов при поверхностном культивировании грибов. В связи с вышесказанным, целью представленного исследования было определение активности ферментов разных классов у высших базидиомицетов разных видов. Объектом исследования были 8 штаммов *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F.Gray, 9 штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril, 10 штаммов *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. и 8 штаммов *Schizophyllum commune* Fr., полученных из коллекции шляпочных грибов Института ботаники им.Н.Г.Холодного НАН Украины (ИБК) и изолированных авторами из плодовых тел, собранных в разных регионах Украины. Наличие гидролитических ферментов (амилазы, протеаз (желатиназная и казеиназная активности), полигалактуроназы, трансэлиминазы, липазы и КМЦ-активности) было исследовано у всех штаммов по методикам описанным Molitoris (2000). Положительная реакция разной интенсивности на исследуемые гидролитические ферменты наблюдалась у всех 35 штаммов. Также для всех штаммов было проведено определение активности ряда окислительных ферментов в условиях роста культур на агаризованных питательных средах разного состава при разных значениях температуры культивирования (от +4 до +30°C). Наличие ферментативных активностей определяли с помощью капельных цветных качественных реакций (Бухало, 1988). Культивирование проводилось на агаризованном пивном сусле, морковном агаре, картофельно-глюкозном агаре, среде Норкранс, среде Чапека. Положительная реакция на лакказу наличествовала у всех штаммов *G.frondosa*, *S.commune* и *P.squamosus* на натуральных средах. На синтетических средах слабую положительную реакцию имели лишь некоторые штаммы *S.commune* и *P.squamosus*. Пероксидазная реакция была положительной практически у всех штаммов *P.squamosus* и только у некоторых штаммов *S.commune*. Активность тирозиназы регистрировалась лишь у некоторых штаммов *G.frondosa* и *S.commune*, на натуральных средах. Штаммы *L.sulphureus* как представители грибов, вызывающих бурую гниль древесины, обладали тирозиназной активностью и не проявляли лакказную и пероксидазную. Температура культивирования практически не влияла на ферментативную активность всех исследуемых штаммов.

Работа выполнялась при поддержке гранта Фонда фундаментальных исследований МОН Украины № Ф 25/ 205-2008

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУР ГРИБОВ ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ ЖИДКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Коршунов Д.В., Дешева Е.А., Ильин В.К., Новикова Н.Д., Мелик-Осипова Л.Е.

*ГНЦ Институт медико-биологических проблем РАН
Москва*

Среди отходов, которые формируются в условиях космического полета, существенная доля приходится на отработанные средства личной гигиены (марлевые салфетки) и отходы растительного происхождения. Эти отходы значительны по массе и объему и содержат продукты выделения организма человека, опасные в санитарно-эпидемиологическом отношении. В перспективе межпланетных перелетов, исходя из требований планетарного карантина, не представляется возможным выносить контаминированный мусор за пределы космического аппарата.

В настоящее время вышеуказанные субстраты исследуются с позиции возможности их биодegradации в анаэробных и аэробных условиях с помощью различных микроорганизмов. Однако, существенную проблему составляет наличие в жидких продуктах биодegradации большого числа органических примесей, которые не позволяют использовать полученные жидкости в качестве технической воды.

Целью данной работы являлась проверка способности монокультур грибов осуществлять разложение жидких органических продуктов, образующихся после первичной деструкции растительных отходов и марли в анаэробных условиях с помощью бактериальных культур.

В соответствии с данной целью были поставлены задачи:

- проверка способности ряда грибных культур расти, используя в качестве источника углерода жидкие продукты биодegradации целлюлозосодержащих и растительных субстратов;
- оценка возможности грибов нейтрализовать кислую среду, полученную после первичного разложения целлюлозосодержащих и растительных субстратов;
- изучение динамики изменения состава равновесного пара культуральных жидкостей до и после применения микроскопических грибов при помощи хроматомасс-спектрометрического анализа.

Нами были выбраны четыре культуры грибов, выделенных из герметично-замкнутых объектов, которые росли в жидкой среде, где в качестве источников углеродов использовали продукты разложения бактериями растительных отходов и марли (*Chaetomium globosum* шт. 25-15, *Trichoderme viride* шт.2-3-1, *Rhodotorula glutinis* шт. 14-6, *Candida sp.* шт.3-3-4). Показана способность этих культур изменять pH среды - со слабо-кислого до нейтрального. По результатам хроматомасс-спектрометрии можно констатировать существенное уменьшение числа органических примесей, содержащихся в первичных продуктах деструкции растительных отходов и марли. Данные культуры оказались способны поддерживать устойчивый рост, питаясь продуктами метаболизма бактерий, осуществляющих первичную биотрансформацию.

Жидкости, полученные после разложения грибными культурами, не представляют опасности как химически агрессивные среды, следовательно, являются потенциально пригодными для использования для жизнеобеспечения пилотируемых космических аппаратов.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об эффективности метода микробиологической переработки отходов и возможности его применения в условиях пилотируемых космических полетов. Наиболее подходящим для этой цели представляется культивирование микроорганизмов (бактерий и грибов) в специализированных ферментерах проточно-каскадным или периодическим способом, поскольку подобная технологическая схема обеспечивает непрерывность и замкнутость последовательных процессов биодegradации.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *LENTINUS TIGRINUS* И *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*

Костина Е.Г., Атыкян Н.А., Чигажева Н.Д., Ревин В.В.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева
Саранск

На сегодняшний день нефть и нефтепродукты являются приоритетными загрязнителями окружающей природной среды. Существующие химические и физические способы утилизации нефтезагрязнений не всегда эффективны, в связи с чем предпочтение отдается микробиологическим технологиям. Долгое время считалось, что основная роль в биодеградации углеводов принадлежит бактериям, однако позднее стало ясно, что следует учитывать и деструкционную деятельность грибов, а также возможность их совместной деятельности. В связи с этим целью работы было изучение убыли дизельного топлива при совместном культивировании культур гриба *Lentinus tigrinus* и бактерии *Rhodococcus erythropolis*.

Объектом исследования служили гриб *Lentinus (Panus) tigrinus* штамм ВКМ F-3616D, выделенный сотрудниками кафедры биотехнологии МГУ имени Н.П. Огарева, и культура бактерий *Rhodococcus erythropolis* штамм ВКМ Ас-858Т, полученная из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Выращивание культур микроорганизмов проводили на среде Эггерта с добавлением 1 и 5% дизельного топлива в перемешиваемых условиях на качалке (200 об/мин) при 26°C в течение 10 суток. Убыль дизельного топлива определяли с помощью концентратомера «КН-2м» (Россия).

В результате проведённых нами исследований было обнаружено, что концентрация дизельного топлива по-разному влияет на его убыль.

При внесении 1% дизельного топлива при культивировании бактерии *R. erythropolis* к 10 суткам роста наблюдалась его максимальная убыль, которая составила 64%. При увеличении концентрации дизельного топлива до 5% убыль его также возрастала, однако она была несколько ниже и к 10 суткам роста культуры составила 58%. Сравнивая убыль 1 и 5% дизельного топлива культурой *R. erythropolis* можно отметить одинаковую закономерность влияния концентрации углеводорода. Не смотря на то, что в варианте с 5% дизельного топлива суммарная убыль ниже, чем в варианте с 1% дизельного топлива, по абсолютным единицам за один и тот же промежуток времени культура *R. erythropolis* «съела» дизельное топливо в 4 раза больше, чем в случае с 1% содержанием.

При культивировании *L. tigrinus* на среде с 1% дизельного топлива убыль данного гидрофобного субстрата к 10 суткам роста составила 40%, а в варианте с 5% - 24%. При этом, как и в случае с *R. erythropolis* убыль дизельного топлива по абсолютным величинам была выше в 5% варианте, хотя по относительным – в 1%. Кроме того, суммарная убыль была в 2-3 раза ниже, чем при культивировании *R. erythropolis*.

При добавлении дизельного топлива в среду при совместном культивировании *L. tigrinus* и *R. erythropolis* максимальная убыль нефтепродукта также наблюдалась на 10 сутки роста и составила в варианте с концентрацией дизельного топлива 1% – 69%, а в варианте с концентрацией дизельного топлива 5% - 65%.

Таким образом, совместное культивирование *L. tigrinus* и *R. erythropolis* на средах с добавлением дизельного топлива приводит к увеличению его убыли и превышает таковое в случае монокультивирования такого активного нефтедеструктора, как *R. erythropolis*, что в свою очередь позволяет активно деструктировать углеводороды нефтепродуктов и может найти широкое применение в технологиях биоремедиации водных экосистем.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Краснопольская Л.М.¹, Автономова А.В.¹, Леонтьева М.И.¹, Соболева Н.Ю.¹, Белицкий И.В.¹, Баканов А.В.¹, Евсенко М.С.¹, Усов А.И.², Исакова Е.Б.¹, Бухман В.М.¹

1 – НИИНА имени Г.Ф.Гаузе РАМН

2 – ИОХ имени Н.Д.Зелинского РАН

Москва

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению противоопухолевой активности фракций водорастворимых полисахаридов, полученных из погруженного мицелия нескольких видов ксилотрофных базидиальных грибов, и нового полисахарида ксиломаннана (КМ), выделенного из мицелия *Ganoderma lucidum*.

В работе использовали штаммы ксилотрофных базидиальных грибов коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИНА имени Г.Ф.Гаузе РАМН. Условия погруженного культивирования были разработаны для каждого из изученных штаммов с учетом их трофических и физиологических особенностей. Из погруженного мицелия получали полисахаридные экстракты и суммарные фракции водорастворимых полисахаридов. КМ был выделен из фракции щелочерастворимых полисахаридов мицелия *G. lucidum*. Изучение противоопухолевой активности проводили *in vivo* на модели подкожно трансплантированного мышинового лимфолейкоза Р388. Ранее было показано (Бухман и др., 2005), что эта модель не является высокочувствительной к препаратам грибных полисахаридов. Это свойство модели позволяет использовать ее для выявления различий в активности исследуемых субстанций. Экстракты полисахаридов и водные растворы суммарных фракций водорастворимых полисахаридов мицелия изучаемых культур вводили перорально один раз в сутки в течение 10 суток. При изучении противоопухолевого действия КМ использовали два пути введения: пероральный и внутримышечный.

Полученные результаты показали, что в условиях использованной модели противоопухолевый эффект водного экстракта каждой из изучаемых культур был достаточно близок к противоопухолевому действию выделенной из него суммарной фракции водорастворимых полисахаридов. В то же время непосредственное пероральное введение высушенного и измельченного мицелия обеспечивало меньший противоопухолевый эффект. Высокую активность в низкой дозе показали суммарные фракции водорастворимых полисахаридов, выделенные из погруженной биомассы *Hericium erinaceus*, *H. ulmarius*, *F. velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Lyophyllum shimeji*, *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor*, *Trametes versicolor*. Торможение роста опухоли при использовании этих препаратов достигало 74-94%.

КМ продемонстрировал высокую противоопухолевую активность как при пероральном, так и при внутримышечном путях введения. Так, однократное введение КМ в суточной дозе 20 мг/кг внутримышечно привело к торможению роста опухоли на 87%. Изучение КМ в диапазоне суточных доз 1-200 мг/кг позволило выявить дозозависимый характер его противоопухолевого действия. Суточные дозы КМ, обеспечивающие наибольшую противоопухолевую активность, различались при разных путях введения. При пероральном пути введения эта доза составила 2 мг/кг, при внутримышечном – 20 мг/кг.

***ASPERGILLUS OCHRACEUS* – ПРОДУЦЕНТ АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

Крейер В.Г., Баранова Н.А., Осмоловский А.А., Пискункова Н.Ф., Кураков А.В., Егоров Н.С.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии
Москва*

Микромицеты рода *Aspergillus* – известные продуценты протеолитических ферментов, обладающих способностью оказывать воздействие на систему гемостаза. Одним из свойств этих ферментов является активирование протеина С плазмы крови человека и животных. Протеин С (ПС) – витамин-К-зависимый профермент, который путем ограниченного протеолиза комплексом тромбин-тромбомодулин превращается в активированный протеин С (ПСа), обладающий антикоагулянтными и профибринолитическими свойствами. Таким образом, ПСа выполняет такие важные функции в крови млекопитающих как предотвращение чрезмерного тромбообразования и усиление фибринолиза, снижая риск возникновения тромбоэмболических осложнений. Недостаточность содержания в крови ПС может привести не только к подобным осложнениям, но и к летальным исходам, в связи с чем в клинических лабораториях проводят анализы содержания ПС в крови пациентов. Поэтому весьма перспективными в лечении, предупреждении и диагностики тромбообразования становятся средства, активирующие ПС.

В настоящее время помимо естественного активатора ПС – комплекса тромбин-тромбомодулин известны экзогенные активаторы: рекомбинантная форма растворимого тромбомодулина (ART-123) и активатор из яда змеи щитомордника (препарат «Протак»). В настоящее время препарат «Протак» широко применяется в составе диагностикумов для определения содержания ПС плазмы крови.

Поиск альтернативных источников подобных активаторов, характеризующихся большей доступностью и дешевизной, является актуальной проблемой. Очевидно, что в качестве таких источников могут выступать микроорганизмы, в частности, микроскопические грибы. Такие работы впервые в мире были проведены на кафедре микробиологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В результате скрининга 116 штаммов микромицетов различных экологических и систематических групп было обнаружено несколько продуцентов протеиназ-антикоагулянтов, активирующих ПС, в частности, *Aspergillus ochraceus*. Количественное определение активаторной активности ферментных препаратов данных продуцентов показало, что она сопоставима с активностью препарата «Протак».

Важным этапом в этой области исследований является направленный поиск новых продуцентов, имеющих определенные преимущества перед уже известными. В последнее время была изучена способность образования активаторов ПС у 9 штаммов микромицета *Aspergillus ochraceus*, выделенных из почв разных областей земного шара и отличающихся по морфологии, пигментации и интенсивности спорообразования. Показано, что данная активность присутствует у всех штаммов, но выражена по-разному. Такая видоспецифичность может быть обусловлена генотипом продуцентов. Максимальная активность в среде культивирования достигается на 3-4 сутки в зависимости от количества и качества посевного материала, от состава среды и условий культивирования. На основании сопоставления активаторной по отношению к ПС активности с активностями по отношению к другим белковым субстратам (казеину, фибрину и др.) отобрано несколько перспективных штаммов, характеризующихся высокой активаторной по отношению к ПС активностью и не проявляющих высоких значений других активностей. Данные активаторы, полученные в чистом виде, в дальнейшем могут найти применение как для функционального определения ПС в крови человека, так и в качестве активаторов ПС для коррекции нарушений системы гемостаза.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *GANODERMA APPLANATUM* (PERS.: WALLR.) PAT. И *G. LUCIDUM* (CURT.: FR.) P. KARST. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ШЛЯПОЧНЫХ ГРИБОВ ИНСТИТУТА БОТАНИКИ ИМЕНИ Н. Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАИНЫ

Круподерова Т. А.¹, Бисько Н. А.¹, Васильева Б. Ф.², Ефременкова О. В.², Полищук Е. Н.³, Коваленко О. Г.³

1 – Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины,

2 – ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН

*3 – Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины
Москва – Киев*

Способность высших базидиомицетов синтезировать комплекс биологически активных соединений с разным характером действия способствует созданию на их основе новых профилактически-лекарственных препаратов и биологически активных добавок отечественного производства.

Исследование биологических особенностей культур при разных условиях культивирования заключалась в тестировании культур на наличие антибиотической, антиоксидантной (АОА) и фитоантивирусной активности.

Объектами исследований были чистые культуры лекарственных грибов – 13 штаммов *G. applanatum* и 27 штаммов *G. lucidum* разного географического происхождения.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии антибактериальных веществ в культуральной жидкости (концентрированной в 10 раз) 6 штаммов *G. applanatum* и 8 – *G. lucidum* против *S. aureus* (MRSA – methicillin resistant), *S. aureus* (MSSA – methicillin sensitive), а также *Bacillus subtilis*. Считается, что синтез антибиотиков происходит при длительном культивировании высших базидиальных грибов. Мы отметили аналогичную тенденцию только для некоторых штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum*. Так, увеличение экспозиции культивирования с 14-ти до 21-ых суток стимулировало появление активности у 33 % штаммов *G. applanatum* и 38% – *G. lucidum*. И, наоборот, длительное культивирование (в течение 21-ых суток) уменьшало антибиотическую активность у 33% штаммов *G. applanatum* и 62% – *G. lucidum*. Активность же 33% штаммов *G. applanatum* на 14 и 21сутки роста была почти одинаковой.

Впервые выявлена антиоксидантная активность культуральной жидкости при поверхностном выращивании у всех исследованных штаммов *G. applanatum* и *G. lucidum* на глюкозо-пептонной среде. АОА культуральной жидкости штаммов *G. applanatum* варьировала в пределах от $0,7 \times 10^{-3}$ л·мл⁻¹·мин.⁻¹ до $3,9 \times 10^{-3}$ л·мл⁻¹·мин.⁻¹, а штаммов *G. lucidum* – от $0,4 \times 10^{-3}$ л·мл⁻¹·мин.⁻¹ до $5,7 \times 10^{-3}$ л·мл⁻¹·мин.⁻¹. Отмечена зависимость АОА мицелия и культуральной жидкости от длительности культивирования. Увеличение времени культивирования увеличивало АОА биомассы, в то же время АОА культуральной жидкости, наоборот, уменьшалась. Значения АОА культуральной жидкости на 7-ые сутки культивирования почти не отличалась от АОА биомассы на 28-ые сутки.

Впервые установлено наличие фитоантивирусной активности культуральной жидкости 7 штаммов *G. applanatum* и 7 штаммов *G. lucidum*, выращенных глубинно на синтетической питательной среде. Инфицирование и количество некрозов вируса табачной мозаики на листьях дурмана (*Datura stramonium* Z.) в основном зависели от биологических особенностей штамма гриба и концентрации водного раствора лиофилизированной культуральной жидкости культур.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Кучмеровская Т.М., Супрун С.М., Аретинская Т.Б., Трокоз В.А.

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины

Национальный университет биоресурсов и природопользования

Киев, Украина

Биомасса грибов вызывает большой интерес у исследователей, поскольку она является уникальным источником многих биологически активных веществ, среди которых большую часть составляют витамины, коферменты, витаминopodobные вещества, убихинон (Q-10) и другие. Большинство из этих веществ проявляют антиоксидантные и антимутагенные свойства. Более того, гликозаминогликаны, в частности хитин, которые являются основными компонентами клеточной стенки грибов придают биомассе грибов еще большую ценность, к тому же, как известно, хитин может использоваться в качестве адсорбента. Технологии использования грибов нашли широкое применение в медицине, экологии и сельском хозяйстве и им принадлежит будущее.

Целью работы было изучение витаминно-коферментного препарата грибного происхождения для возможного его использования при выкармливании гусениц, инфицированных микроспоридиями.

На основе селекционированных штаммов грибов *Fusarium sambucinum* и *Penecillium sclerotiorum* получен препарат с высоким содержанием некоторых витаминов, в частности витамина В₃, биотина и β- каротина, а также других важных компонентов, таких как ненасыщенные жирные кислоты.

Известно, что наиболее опасным и широко распространенным заболеванием дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) является микроспоридиоз. Инвазии осуществляются облигатными паразитическими простейшими - микроспоридиями *Vairamorpho antheraeae*. Этот внутриклеточный паразит оказывает пагубное влияние на жизнеспособность полезных насекомых, гормональный гомеостаз, репродукцию и резистентность к другим патогенам. Обнаружено, что витаминно-коферментный препарат способствует повышению резистентности дубового шелкопряда к инвазионному заболеванию - микроспоридиозу. Обработка гусениц исследуемым препаратом обеспечила снижение их гибели от микроспоридиоза на 9,0-16,5% по сравнению с контролем. Последствие препарата зарегистрировано также в период завивки коконов и окукливания насекомых. Благодаря этому, после созревания выход качественных коконов, пригодных для размотки, увеличился на 12,0-24,5% по сравнению с контролем. Использование препарата способствовало ускорению развития гусениц дубового шелкопряда, поскольку они завивали коконы в среднем на 6-7 суток раньше, чем контрольные. Более того, препарат стимулировал продуктивность дубового шелкопряда, при этом наблюдалось увеличение массы коконов на 8-12% у самок и на 6-9% у самцов. Одновременно наблюдали увеличение массы шелковой оболочки кокона на 23-31% у самок и 37-40% у самцов. Обнаружено также, что жидкая форма препарата снижает зараженность сапролегниозом при обработке икры карпа.

Таким образом, витаминно-коферментный препарат на основе грибов имеет важное лечебно-профилактическое значение, поскольку позволяет эффективно защищать полезных насекомых от инвазионных заболеваний. Тот факт, что препарат проявляет стимулирующее действие на рост, развитие и продуктивность дубового шелкопряда делает его весьма перспективным для использования.

ОСОБЕННОСТИ ИНФИЦИРОВАНИЯ СУБСТРАТА ШИИТАКЕ (*LENTINUS EDODES*) ПРИ РАЗНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СПОСОБАХ ИХ ПРОИЗВОДСТВА

Лавлинский А.В., Богдаев А.Г.

Воронежский государственный университет

Воронеж

Проведен анализ результатов работы ряда частных лабораторий и промышленных производств г. Москвы и Московской области, Воронежа и др., специализирующихся на изготовлении субстратов шиитаке (*Lentinus edodes*) в упаковках сходного объема, формы и субстратной формулы. Анализ стерильности заключался в учете количества блоков, имеющих контаминантные очаги (в основном, зеленые плесени - *Trichoderma* и др.), конкурентно развивающиеся в субстрате в начальной фазе инкубации блоков в условиях их промышленного производства.

Было выявлено наличие зависимости результатов от уровня механизации операций по производству блоков шиитаке. Все предприятия и лаборатории, в которых проводилось исследование степени зараженности упаковок с субстратами шиитаке, в зависимости от степени их механизации были условно разделены нами на следующие группы: ручное изготовление блоков; частично механизированные линии с нестабильной работоспособностью и неустойчивыми результатами; механизированные линия, обеспечивающие стабильный результат независимо от объема партии блоков. Обобщенные результаты анализа представлены в таблице.

Объем производства и контроль качества субстрата на наличие контаминант	Степень механизации производства субстрата		
	Производство на основе ручного труда	Частично механизированное производство	Полностью механизированное производство
Прогнозируемость заражения субстрата	Отсутствует	Полностью отсутствует	Присутствует
Величина объема производства и качество субстрата	Обратная зависимость	Обратная зависимость разной степени	Слабая зависимость

Из таблицы следует, что наиболее результативным по производству стерильных субстратных блоков шиитаке является способ механизированного производства. Кроме того, этот вариант характеризуется относительно высоким уровнем стабильности производственного процесса; при отлаженном процессе незначительные отклонения в технологическом регламенте не оказывают влияния на результат. Вторым по результативности является ручной способ производства блоков шиитаке. Ручное производство характеризуется высокой степенью зависимости качества от большого ряда факторов, в первую очередь человеческого. Положительная особенность ручного производства в том, что без увеличения затрат, в короткие сроки возможно осуществить реорганизацию небольшого убыточного производства с высоким процентом брака в производственный процесс с минимальным инфицированием субстрата и другими формами брака. Наименее эффективным, по нашему мнению, является способ производства стерильных субстратных блоков с неустойчивой механизацией, при котором практикуется компенсация недостатков механизированного проведения операций ручным трудом. Это приводит: - к объединению отрицательных моментов использования ручного труда и использования примитивной механизации; - непредсказуемости объема, качества и формы компенсации ручным трудом недостатков механизированного производства блоков шиитаке. В промышленном производстве все это равнозначно отсутствию производственного регламента при изготовлении субстратных блоков шиитаке.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (PLEUROTUS OSTREATUS) НА ТВЕРДОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ В ПРИСУТСТВИИ ТРИХОДЕРМЫ (TRICHODERMA SP.)

Лавлинский А.В., Смирнова Ю.В.

Воронежский государственный университет

Воронеж

Зеленые плесени представляют наибольшую опасность для развития мицелия Вешенки обыкновенной при интенсивной технологии ее культивирования на различных целлюлозосодержащих субстратах. Особое место среди плесневых несовершенных микромицетов занимают виды рода *Trichoderma*, которые являются не только активными трофическими конкурентами в субстрате, ингибируя рост и развитие грибницы вешенки, но и в ряде случаев непосредственно паразитируют на ней.

С целью изучения особенностей взаимоотношений данных видов при их совместном произрастании нами был поставлен опыт, в котором инокулюм мицелия Вешенки обыкновенной и Триходермы был внесен одновременно на твердую питательную среду (агар-агар с ингредиентами) в чашки Петри на расстоянии 5 см друг от друга. Вешенка обыкновенная была представлена наиболее распространенными культивируемыми штаммами: НК-35, К-12, М5, «Черный принц». Представителем рода *Trichoderma* был штамм, выделенный из пораженного Триходермой субстрата. Работа проводилась в лаборатории кафедры генетики, цитологии и биоинженерии и культивационном цехе по выращиванию Вешенки ботанического сада Воронежского госуниверситета. Проводились визуальные наблюдения за ростом и развитием колоний мицелия изучаемых объектов как в опытных вариантах при их совместном нахождении в одной чашке Петри, так и в контрольных, где были только штаммы Вешенки обыкновенной. Также количественно определялся линейный рост колоний во всех вариантах опыта. Измерения проводились ежедневно до момента полного зарастания поверхности питательной среды в чашках Петри мицелием изучаемых объектов. Полученные данные обрабатывались статистически.

Визуальные наблюдения роста колоний мицелия изучаемых штаммов Вешенки в присутствии Триходермы показали, что на участках соприкосновения мицелия этих видов на поверхности питательной среды наблюдались четкие границы в виде уплотненных зон. Результаты изучения динамики роста колоний мицелия штаммов Вешенки обыкновенной в контрольном и опытном вариантах показали на общую закономерность более быстрого роста мицелия вешенки в отсутствие на питательной среде мицелия Триходермы. Исключением был штамм Вешенки НК-35, у которого в контрольном варианте мицелий рос несколько медленнее, чем в присутствии Триходермы. Наиболее интенсивный рост мицелия в присутствии Триходермы наблюдался у штамма Вешенки К-12. Для оценки влияния факторов наличия плесневого контамината (Триходермы), генотипических различий у штаммов Вешенки, а также возраста их колоний мицелия был проведен трехфакторный дисперсионный анализ, показавший на статистически достоверное влияние ($P \leq 0,001$) данных факторов (F-критерий) и их взаимодействия. Наибольшая степень влияния (h^2) на интенсивность роста и размеры колоний мицелия Вешенки была выявлена у факторов возраста колоний (36,8%) и наличия мицелия Триходермы (17%), несколько меньшая (12,4%) – у фактора генотипических различий изучаемых штаммов Вешенки.

Полученные нами результаты могут быть использованы в практике промышленного выращивания Вешенки обыкновенной по интенсивной технологии для подбора наиболее конкурентоспособных к Триходерме штаммов.

ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА БИОМАССЫ ГРИБА FUSARIUM SAMBUCINUM НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ САМОК СОБОЛЕЙ.

Лоенко Н.Н., Пучков А.В., Чернова И.Е..

ГНУ НИИПЗК имени В.А. Афанасьева

п. Родники, Московская обл.

Биологически активные добавки на основе биомассы гриба *Fusarium sambucinum* (*F. sambucinum*), полученные путем биотехнологии «Флоравит» на базе ООО «Гелла-Фарма», представляют собой композицию биологически активных веществ, продуцируемых мицелиальным грибом *F. sambucinum*. Основными компонентами добавок являются фосфолипиды, свободные жирные кислоты, антиоксиданты, каротиноиды, ферменты, полисахариды, а также витамины А, Е, D₃, Н и группы В. (Григораш А. И, Макланов А. И и др., 2002 г., Григораш А. И, Макланов А. И. и др., 2004г).

В медицине БАД «Флоравит» применяется для поддержания функций желудочно-кишечного тракта, печени, коррекции иммунитета. Это свидетельствует о многоплановом воздействии данного препарата на гомеостаз человека. По мнению авторов, представляется целесообразным выделить биорегулятор «Флоравит» в отдельную группу препаратов – биосинергетики.

Повышение показателей воспроизводства самок соболей - актуальная задача для соболеводства. Для поддержания достигнутой продуктивности соболей предлагается использовать в их рационах кормовые добавки, полученные на основе гриба *Fusarium sambucinum*.

Целью данной работы было изучить действие экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* на репродуктивную функцию самок соболей.

Научно-хозяйственные опыты проводили на основном стаде самок соболей в течение двух лет. Было проведено три эксперимента на 200 самках.

В корм опытной группы добавляли экстракт биомассы гриба *F. sambucinum* (водный раствор «Флоравит») по 1,0 мл на голову в сутки, ежедневно. По окончании опыта проводили учет показателей воспроизводства самок.

Изучение влияния «Флоравита» на репродуктивный потенциал самок соболей проводили:

- в период истинной беременности и лактации при добавлении препарата в рацион в течение 3-4 месяцев;
- при введении в течение года добавки в корм (гон, латентная фаза, истинная беременность и лактация);
- при двухлетнем введении.

В результате проведенных исследований было установлено, что включение экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* в рацион самок соболей в период беременности и лактации (3-4 мес.) в количестве 1,0 мл на голову в сутки положительно влияет на их воспроизводительную функцию. При этом снижается количество пропустовавших самок на 26,6% и увеличивается выход молодняка на основную самку на 0,79 щенка ($P > 0,99$) по сравнению с контролем.

Применение кормовой добавки в течение года и двух лет обеспечило лучшую реализацию репродуктивного потенциала самок соболей. Выход молодняка на основную самку повысился по сравнению с коротким периодом введения добавки (3-4 мес.) на 0,29 щенка и с контролем – на 0,83 щенка.

Таким образом, на основании полученных результатов установлено положительное влияние на репродуктивную функцию самок соболей экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* при длительном включении добавки в рацион самок.

ПРИМЕНЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ, КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ ГРАНУЛООБРАЗОВАНИЯ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *LENTINUS TIGRINUS* ШТАММ ВКМФ – 3616 D ПРИ ПОГРУЖЕННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Малушкин С. В., Васильев Р. С., Кадималиев Д. А.

*Мордовский Государственный Университет имени Н. П Огарева
Саранск*

Известно, что накопление биомассы микроорганизмами при погруженном культивировании зависит, прежде всего, от содержания биогенных элементов и условий культивирования. В отличие от бактерий рост и развитие мицелиальных грибов имеет свои особенности. Наряду с вышеприведенными факторами, накопление биомассы этими грибами также зависит от количества так называемых «центров» роста. При культивировании в жидких средах грибы растут в виде мицелл, которые трудно осадить или отделить от среды. По мнению ряда авторов, эти проблемы можно решить, если создать такие условия, при которых гриб будет расти в виде пеллетов (гранул) или на нерастворимых носителях, колонизируя их.

Ранее нами было показано, что гриб *Lentinus tigrinus* штамм ВКМФ – 3616 D хорошо растет в среде содержащей органические компоненты, а в частности фенола в концентрации до 3% и обладает высокой ферментативной активностью. Но в ходе культивирования гриб медленно накапливал биомассу, и в связи с этим для повышения выхода биомассы с сохранением физиологической активности использовали неорганические носители.

Жидкофазное культивирование гриба *L.tigrinus* штамм ВКМФ – 3616 D проводили на среде Чапека-Докса. В опытные среды в зависимости от предложенных схем добавляли неорганический носитель: керамзит и пемзу. В ходе культивирования отбор проб образцов проводили на 3, 6, 9 сутки. В контрольных и опытных образцах определяли содержание внеклеточного белка, лакказную активность, пероксидазную, Мп-пероксидазную, а так же прирост биомассы.

Наши исследования показали, что мицелий гриба активно колонизирует пористый неорганический носитель при твердофазном и жидкофазном культивировании, иммобилизуясь на поверхности и внутри пор, а так же отмечено повышение ферментативной активности в опытных средах по сравнению с контролем 1,5 – 2 раза. Это значительно повышает жизнеспособность клеток и позволяет легко отделить биомассу от жидкой среды, что важно для практического использования грибов в технологиях очистки фенолсодержащих сточных вод и биоконверсии ксенобиотиков. Добавление неорганических носителей вызывает повышение скорости прироста биомассы, не снижая ферментативной активности. По-видимому, это связано с тем, что при твердофазном культивировании мицелий гриба адсорбируется на поверхности и внутри пор носителя, образуя новые «центры» роста. Далее при жидкофазном культивировании, при перемешивании, носители, разбивая мицелий гриба, образуют дополнительные «центры» роста биомассы. Такая технология культивирования позволяет более 85% биомассы сконцентрировать на носителях. В стационарных условиях, без перемешивания, неорганический носитель с иммобилизованной биомассой и легко отделить от среды.

Таким образом, неорганические пористые носители можно применять для иммобилизации мицелия гриба с сохранением физиологической активности, что позволит использовать одну и ту же биомассу многократно в непрерывных и периодических режимах очистки сточных вод.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИДОВ *MORCHELLA* DILL. НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Михайлова О.Б., Бухало А.С., Поединок Н.Л.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины

Киев

Актуальным направлением современных микологических и биотехнологических исследований остается создание высокоинтенсивных производств, которые направлены на получение грибного мицелия и метаболитов лекарственных макромицетов на основе их глубинного культивирования. Это открывает реальную перспективу практического использования в качестве продуцентов пищевой биомассы видов ценных, лекарственных макромицетов, которые из-за своих биолого-экологических особенностей не образуют плодовые тела в искусственных условиях. К таким грибам относятся сумчатые макромицеты из рода *Morchella*, которые в США глубинно культивировали в промышленных масштабах, в основном для получения мицелиальной массы с высоким содержанием белка и специфическим грибным ароматом [Litchfield et al., 1963; Litchfield 1967; Le Duy et al., 1974].

В Институте ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины на базе Национальной Коллекции культур шляпочных грибов (ИБК) разрабатываются научные основы биотехнологии культивирования важнейших видов лекарственных грибов, в том числе и видов рода *Morchella*. Исследования биологических свойств этих грибов, направлены на определение оптимальных условий поддержания и сохранения их в чистой культуре, проведения скрининга культур по различным критериям, подбор питательных сред для культивирования селективированных штаммов, в том числе и в условиях глубинной культуры. Грибы рода *Morchella*, известные как сморчки, издавна используют в традиционной восточной медицине [Chang, Hayes, 1978; Ying et al., 1987]. Современными исследованиями доказано, что метаболиты сморчков, полученные как из природных плодовых тел, так и из мицелиальной массы, выращенной на жидких питательных средах, обладают противовоспалительным, иммуностимулирующим, онкостатическим действием [Duncan 2002; 2003; Prasad et al., 2002; Nitha et al., 2007]. Нами исследовано 27 штаммов 8 видов рода *Morchella*: *M. angusticeps* Peck., *M. conica* Pers., *M. crassipes* (Vent.) Pers., *M. elata* Fr., *M. esculenta* (L.) Pers., *M. semilibera* DC., *M. spongiosa* Boud., *M. steppicola* Zer. и получены новые данные о физиологических особенностях чистых культур этих видов при выращивании на комплексных и синтетических жидких средах. Для всех исследованных штаммов установлены благоприятные для роста мицелия значения кислотности среды (в пределах pH 5,5-6,5), источники углерода (глюкоза и крахмал), азота (пептон и аспарагин). Разработан состав питательной среды с органическими источниками углерода и азота (глюкоза, пептон и дрожжевой экстракт), который обеспечивает выход мицелиальной массы у штаммов *Morchella conica* 1737, *M. esculenta* 1755 до 17 г/л и экзополисахаридов до 4,5 г/л на 7 сутки культивирования. В результате скрининга отобраны наиболее активные продуценты биомассы, которые по комплексу признаков можно отнести к перспективным продуцентам мицелиальной массы. Все селективированные штаммы имели продуктивность более 2,9 г/л/сутки, мицелий обладает стойким характерным грибным ароматом и содержанием сырого протеина до 32 %. При исследовании микроструктур вегетативного мицелия с помощью сканирующей электронной микроскопии отмечено образование конидиальных спороношений типа *Constantinella terrestris* (Link.: Gray) Hughes у *M. conica*, *M. esculenta* *M. steppicola*, бесполок спороношений в виде разветвленных цепочек почкующихся клеток у *M. angusticeps*, *M. crassipes*, *M. semilibera*. У всех исследованных видов наблюдались лакунозные гифы, многочисленные анастомозы. Выявленные микроморфологические признаки дают возможность осуществлять контроль чистоты культуры в вегетативной

стадии развития. Дальнейшей задачей является оптимизация условий глубинного культивирования отобранных штаммов с целью получения мицелиальной массы.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ *PENICILLIUM PICEUM* F-648 АЗ – ПРОДУЦЕНТА КАТАЛАЗЫ

Мороз И.В., Павловская Ж.И., Михайлова Р.В.

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»

Минск

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – широко распространенный в природе фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует реакцию разложения пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды. Каталаза применяется в легкой, химической, пищевой промышленности, медицине и научных исследованиях.

Ранее нами методом адаптационной селекции продуцента каталазы *Penicillium piceum* F-648 к H₂O₂ получен штамм *Penicillium piceum* F-648 АЗ, отличающийся повышенным уровнем образования фермента (1). Гриб *P. piceum* F-648 АЗ в течение длительного времени (7 лет) хранится методом периодических пересевов на агаризованной модифицированной среде Чапека с 6 % глюкозы и 2,9 мМ H₂O₂. Известно, что в процессе хранения микроорганизмы могут диссоциировать на варианты, различающиеся по генетическим, морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам. Естественная изменчивость может привести как к утрате ценных свойств и дегенерации штамма-продуцента, так и обеспечить возможность отбора из популяции более активных вариантов. В связи с этим, целью данной работы было изучение спонтанной изменчивости *P. piceum* F-648 АЗ, анализ морфологических особенностей и биохимических свойств выделенных вариантов. Исследования проводили, используя модифицированный метод Дмитриева с соавторами [2], позволяющий отобрать и оценить свойства моноконидиальных или моноклеточных культур, на которые может дифференцироваться популяция гриба.

Изменчивость морфологических признаков колоний *P. piceum* F-648 АЗ анализировали на 7 сутки их роста на наборе агаризованных питательных сред: сусло, Чапека, Райстрика, Чапека с 6 % глюкозы. В результате выявлены 2 морфологические варианта культуры: *P. piceum* F-648 АЗ-1 и *P. piceum* F-648 АЗ-2, различающиеся окраской воздушного и субстратного мицелия, формой и размером колоний. Выделенные варианты воспроизводились на различных средах при моноспоровых посевах.

Сравнительный анализ биохимических свойств морфологических вариантов *P. piceum* F-648 АЗ показал, что они различаются по способности к синтезу каталазы. Установлено, что уровень синтеза фермента и продуцирующая способность мицелия у варианта *P. piceum* F-648 АЗ-2 превышают аналогичные показатели для исходной культуры на 25 % и 14 % соответственно. *P. piceum* F-648 АЗ-1 по ферментативной активности сравним с исходной культурой, но незначительно уступает ему по продуцирующей способности мицелия.

Таким образом, в результате изучения спонтанной изменчивости *P. piceum* F-648 АЗ установлено, что гриб вариабелен, расщепляется на 2 морфологические варианта. Для дальнейшей работы отобран вариант *P. piceum* F-648 АЗ-2, характеризующийся повышенным уровнем синтеза каталазы и продуцирующей способности мицелия гриба.

Исследования проводились при финансовой поддержке БРФФИ (проект № Б08МЛД-018). Литература.

1. Павловская Ж.И., Мороз И.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г. Адаптация к пероксиду водорода *Penicillium piceum* F-648 – продуцента каталазы // Матер. Междунар. научн. конф «От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям», Гомель, 2-5 октября 2007 г. – Гомель, 2007. – С. 116-117.
2. Дмитриев В.В., Мацкевич Н.В., Новикова Н.Д., Лемох Т.С. // Прикл. биохимии и микробиол. – 1966. – Т. 2, № 3. – С. 248-252.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СОСТАВА ЛИПИДОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИЯХ РЕЖИМА АЗОТНОГО ПИТАНИЯ *MUCOR CIRCINELLOIDES* VAR. *LUSITANICUS* – ПРОДУЦЕНТА γ -ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Мысякина И.С., Фунтикова Н.С.

Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН

Москва

γ -Линоленовая кислота является активным началом многих лекарственных препаратов, используемых в медицине, косметике и диетологии. Эту полиненасыщенную кислоту получают из семян растений, в частности, из примулы вечерней (*Oenothera*). Однако успехи, полученные в последние годы при изучении липидов грибов, стимулировали исследования по созданию биотехнологий получения γ -линоленовой кислоты из биомассы таких мицелиальных грибов как *Mortierella*, *Cunninghamella* и *Mucor*.

В ИНМИ РАН был запатентован способ получения γ -линоленовой кислоты из мицелия *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* (патент РФ №751212), согласно которому гриб-продуцент образовывал до 40% γ -линоленовой кислоты от общего содержания жирных кислот, что позволило считать этот организм весьма перспективным для дальнейшего использования в биотехнологии с целью получения медицинских препаратов. Большое значение в поддержании высокой продуктивности культуры имеет регулирование процесса липогенеза изменениями режима азотного питания.

Исчерпание питательных веществ при культивировании мицелиальных грибов является мощным фактором, затрагивающим все клеточные процессы, в том числе, липогенез. В условиях лимита азотного питания изменяется метаболическая активность, что вызывает изменения в синтезе липидов. Соотношение углерода и азота в среде имеет большое значение для накопления липидов: при изначально высоком содержании источника углерода и истощении источника азота в среде в процессе периодического культивирования биосинтез белка и нуклеиновых кислот прекращается, но избыток углерода продолжает метаболизироваться в липиды, при этом падает общая метаболическая активность и снижается выход γ -линоленовой кислоты. Режим азотного питания гриба *M. circinelloides* var. *lusitanicus* при однократном добавлении источника азота в питательную среду при посеве или его дробном внесении в режиме с подпиткой оказывал влияние на морфогенез, синтез γ -линоленовой кислоты, а также на уровень липидов в биомассе. При выращивании в режиме однократной подачи источника азота наблюдались деформации мицелия гриба и образование артроспор, которых не отмечалось у культуры того же возраста, выращенной при подпитке источником азота. Морфологические различия коррелировали с изменениями в активности ферментов центрального метаболизма: при подпитке источником азота отмечалась более низкая активность ферментов глиоксилатного цикла (изоцитратлиазы), чем ферментов цикла трикарбоновых кислот (НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы), а также повышенное содержание γ -линоленовой кислоты (до 35%) и суммарного содержания ФХ+ФЭА (до 27,3% от суммы полярных липидов), которые являются основными субстратами десатурации у этого гриба. Эти показатели являются маркерами более высокой метаболической активности культуры при подпитке источником азота. Таким образом, в условиях, исключающих азотное голодание, имеет место активное функционирование ферментов ЦТК, которое обеспечивает поступление строительного материала, коферментов и энергии для биохимических синтезов, и образование ненасыщенных жирных кислот, в особенности, γ -линоленовой, обуславливающих высокую функциональную активность мембран. Резкое снижение соотношения C/N в среде за счет быстрого внесения источника азота в режиме с подпиткой, вызывает мобилизацию многих ферментных систем, способствует поддержанию повышенного уровня метаболической активности и нормальной морфологии мицелия и приводит к увеличению выхода γ -линоленовой кислоты.

СПОСОБ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ШЕРСТИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

Обрезкова А.В., Белова Н.В., Шамолина И.И.

Санкт-Петербургский Государственный Университет Технологии и дизайна

Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН

Санкт-Петербург

Важным направлением развития отраслей промышленности, перерабатывающих сырье животного происхождения, является сокращение потерь и рациональное использование сырья и отходов с привлечением экобиотехнологии.

Ценным и востребованным отечественным природным сырьем является овечья шерсть. На кожевенных заводах получают заводскую шерсть из шкур забитых животных. Шерсть шкур молодых животных и овец мясо-шерстного и мясного направления, непригодную для переработки в текстильной, либо валяльно-войлочной промышленности, утилизируют путем компостирования, переработки в удобрения, получения биогаза, либо подвергают захоронению. Значительные количества шерсти содержатся в отходах, образующихся при контурировании шкур на мясокомбинатах или на кожевенных предприятиях. Шкуры необработанные, некондиционные, а также их остатки и обрезки включены в федеральный классификационный каталог отходов.

Нами изучался биотехнологический метод утилизации шерсти этих отходов, включающий отделение шерсти от дермы путем обезволашивания шкуры, и последующее ее использование в качестве субстратной добавки при культивировании базидиомицетов – продуцентов окислительно-восстановительных ферментов пероксидазы и лакказы.

Шерсть получали ферментативной обработкой с использованием отечественных препаратов протеолитического действия, обеспечивающих полное обезволашивание отходов шкур с сохранением структуры дермы.

Для последующей утилизации шерсти использовали культуры базидиомицетов из Коллекции Ботанического института им. В.Л. Комарова: *Trametes maxima* (Montagne) A. David et Rajchenberg, *Corioloopsis caperata* (Berkeley) Murrill (= *Corioloopsis fulvocinerea*), *Pholiota highlandensis* (Peck) A. N. Smith et Hesler, *Trametes hirsuta* (Wulfen : Fries) Pilat, *Trametes ochracea* (Persoon) Gilbertson et Ryvarden (= *Coriolus zonatus*).

Выращивание базидиомицетов проводили поверхностным способом в конических колбах вместимостью 500 мл при температуре 24-26 °С. Питательная среда содержала в (г/л): глюкоза – 10, пептон – 3, KH_2PO_4 – 0.6, K_2HPO_4 – 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CuSO_4 – 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005. Питательную среду и отходы шерсти стерилизовали при давлении 1 атм в течении 15 мин. В подготовленную среду вносили отходы шерсти в количестве 10 % от ее массы одновременно с засевом культур базидиомицетов. Культивирование проводили в темной аэрируемой камере в течение 20 сут. По окончании срока культивирования в культуральных фильтрах определяли активность окислительных ферментов – пероксидазы и лакказы. Установлено, что активность окислительных ферментов, продуцируемых базидиомицетами (за исключением *Corioloopsis caperata*), на питательной среде, содержащей отходы шерсти многократно увеличивается по сравнению с контролем.

Это позволяет отнести отобранные для исследований базидиомицеты *Trametes maxima*, *Pholiota highlandensis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea* к биообъектам перспективным для получения ферментных препаратов в виде фильтратов культуральных жидкостей, содержащих пероксидазу и лакказу и подтверждает целесообразность дальнейшего развития биотехнологического метода переработки не утилизируемых отходов шерсти с участием базидиомицетов.

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЧЕРНЫЕ И КОРИЧНЕВЫЕ ПИГМЕНТЫ (МЕЛАНИНЫ) – ИСТОЧНИКИ НОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ВЫСОКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В.

*Научно-исследовательский институт биологии при Иркутском государственном университете
Иркутск*

Природные полимеры меланины - это собирательное название для групп высокомолекулярных черных и коричневых пигментов, образующихся при окислительной полимеризации фенолов как содержащих азот, так и не содержащих его. Меланины очень широко распространены в природе и содержатся во многих тканях человека, животных, встречаются у растений и грибов (микро- и макромицетов).

Живая клетка использует ДНК, РНК и большое количество белка для того чтобы построить клеточные органеллы нанометрических размеров, поэтому логично использовать их для создания, например, новых материалов с неизвестными ранее свойствами. Этому требованию отвечают гранулированные электронно-плотные образования грибной клетки (пигмент), составляющие основной компонент наружного слоя стенок мицелия и конидий. Из пигментов грибов наиболее известен меланин – длинноцепочечный полимер с высоким молекулярным весом и сложной спиралевидной жидкокристаллической структурой. Различают меланин, накапливающийся на поверхности мицелия в виде гранул диаметром 75-100 нм, и внеклеточный, гранулированный меланин, проходящий через поры 1-2 нм.

Разработана технология получения меланина из гифальных грибов: выращивание продуцентов, выделение и очистка как внутри-, так и внеклеточного меланина и водорастворимого меланина из растительного сырья.

Полученные препараты охарактеризованы по ряду физико-химических показателей и исследованы методом оптической спектроскопии.

Известно, что меланины могут отличаться по структуре и строению мономерных звеньев, а также по количеству этих звеньев в полимерной цепи. Поэтому небольшие различия в элементном составе грибного и гречишного меланинов не вызывают удивления (грибной меланин - содержание С - 40,85; Н - 5,56; N - 2,40; водорастворимый растительный - С – 42,36; Н – 5,56; N – 2,01), некоторые различия наблюдаются и в ИК-спектрах. Отличия в спектрах ЭПР только в концентрации парамагнитных центров (ПМЦ) (грибной меланин- $6 \cdot 10^{18}$ спин/г; водорастворимый растительный - $8 \cdot 10^{17}$ спин/г). Одной из причин некоторого снижения концентрации ПМЦ в гречишном меланине по сравнению с грибным меланином может быть более низкое содержание феноксильных радикалов в первом. Другой причиной различия концентрации парамагнитных центров грибного и гречишного меланинов могут быть некоторые особенности полисопряженной структуры этих меланинов.

Препараты грибного меланина и водорастворимого из растительного сырья могут быть использованы в качестве биостимуляторов роста растений, для повышения радиорезистентности животных и человека. Известны исследования по применению грибных меланинов в качестве противораковых препаратов, ингибиторов перекисного окисления липидов (антиоксидантов), для защиты теплокровных от ультрафиолетового облучения.

БИОСИНТЕЗ ТИАМИНА МИТОСПОРОВЫМИ ГРИБАМИ

Пархоменко Ю.М.¹, Супрун С.М.¹, Харкевич Е.С.², Донченко Г.В. ¹

¹ – Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины

² – Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К.Заболотного НАН Украины
Киев, Украина

Микромицеты как продуценты биологически активных соединений, в частности витаминов, являются наиболее технологичными по сравнению с другими таксономическими группами микроорганизмов. В этом плане одним из существенных достоинств микромицетов является их способность к сверхсинтезу отдельных витаминов с выделением их в культуральную среду или накоплением в мицелии. Эта способность может быть повышена за счет селекции штаммов и использования культуральных сред со специальными добавками, активирующими синтез того или иного витамина или его биологически активных производных.

В настоящее время большинство витаминов получают в промышленном масштабе путем химического синтеза. Производство тех же витаминов с использованием биотехнологий может быть более экономичным и значительно более экологичным. Поэтому поиск перспективных продуцентов – сверхсинтетиков отдельных витаминов является актуальной современной проблемой. Целью данного исследования было поиск среди микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам микромицетов, штаммов, способных синтезировать тиамин (витамин В₁) в повышенных количествах, изучение физиолого-биохимических особенностей отобранных штаммов, поиск приемов для повышения выхода тиамина при культивировании этих штаммов. Проведен поиск продуцентов тиамина среди 18 видов митоспоровых грибов, принадлежащих к 9 родам классов *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*. Выявлены штаммы активных продуцентов среди видов: *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*. Характерной особенностью штаммов, продуцирующих повышенные количества тиамина, является значительное накопление внеклеточного тиамина.

С использованием биохимического антагониста тиамина – окситиамина при внесении его в среду в возрастающей концентрации ($5 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ М) с трехкратным пассированием была проведена селекция отобранных штаммов. В результате проведенной селекции удалось на порядок повысить биосинтез тиамина штаммом *F. sambucinum*.

Молекула тиамина состоит из двух гетероциклов – тиазолового и пиримидинового, уникальных по своей структуре. В клетках микроорганизмов эти гетероциклы синтезируются отдельно, и лишь на последнем этапе происходит их конденсация с образованием тиаминмонофосфата. Показано, что некоторые микроорганизмы способны к избыточному синтезу только одного из этих компонентов, а второй является лимитирующим. Чаще всего лимитирующим является тиазоловый компонент. С целью выявить штаммы, синтезирующие избыток пиримидинового фрагмента молекулы тиамина, мы выделили в очищенном состоянии тиазоловый фрагмент, и провели серию исследований с добавлением его в культуральную среду. Благодаря такому подходу, мы добились значительного повышения выхода тиамина при культивировании отобранных штаммов *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *Cladosporium herbarum*. Полученные данные дали возможность подобрать ассоциативную культуру возможных продуцентов тиазолового и пиримидинового оснований. При совместном культивировании штаммов-продуцентов *F. solani* и *F. sambucinum* получено увеличение выхода тиамина в 3-4 раза по сравнению с монокультурами.

ВЛИЯНИЕ РАЗНОВИДОВОГО ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ПРОМЫШЛЕННОГО ШАМПИНЬОНА

Петренко Б. Ф.

Национальный университет биоресурсов и природопользования
Киев, Украина

В последние годы в Украине интенсивно развивалось промышленное грибоводство. Основной рост и развитие технологии припадало на компостное производство и на систему культивирования плодовых тел грибов. В то же время объем производства мицелия отставал от отрасли в целом, что обусловлено засильем на рынке именитых мировых мицельных брендов. Для исправления ситуации и с перспективой дальнейшего роста грибной отрасли в Украине целесообразным видится развитие технологии отечественного производства мицелия шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus*).

Существует много информации об общих вопросах мицельного производства *A. bisporus*, но мало пригодной для производства качественного конкурентноспособного мицелия, так как промышленная информация остается закрытой. В связи с этим на начальном этапе была поставлена задача изучить зерновые носители мицелия *A. bisporus* с целью дальнейшего применения полученных данных для разработки научно- и экономически обоснованной отечественной промышленной технологии производства мицелия.

Исследуемыми зерновыми носителями для мицелия *A. bisporus* выступали зерно пшеницы (ПШ), ржи (РЖ), ячменя (ЯЧ) и овса (ОВ). За контроль выступал коммерческий мицелий Sylvan на зерне пшеницы штамм Hauser A15 (SY), которым также были засеяны исследуемые образцы зерна для получения мицелия. Все исследования по получению мицелия и испытания на продуктивность проводились на базе промышленного грибного хозяйства в агрокомбинате «Пуща-Водица» (г. Киев).

В результате полученных данных показано отсутствие влияния вида зерна на общую урожайность за результатами двух волн плодоношения. Урожайность при этом становилась максимальной 32,1% от веса компоста у варианта РЖ и минимальная 27,63% – у ПШ. Статистически существенные отличия от контроля (SY) были только у вариантов ЯЧ и ОВ на первой и второй волнах плодоношения. Заметно, что эти два варианта на первой волне плодоношения уступали варианту SY (5,75 и 4,55 кг/100 кг компоста, соответственно ЯЧ и ОВ; НСР₀₅ = 4,07 кг/100 кг компоста), а на второй волне – превышали (4,60 и 4,49 кг/100 кг компоста, соответственно ЯЧ и ОВ; НСР = 4,17 кг/100 кг компоста).

Отличия были получены по качеству выходу плодовых тел грибов. Так, варианты ЯЧ и ОВ существенно превышали SY по выходу грибов 1 сорта на первой волне плодоношения и вариант ОВ на 7% дал больше 1 сорта (69,9 %) за итогами всего цикла плодоношения по сравнению с SY. Остальные варианты статистически не отличались от контроля.

Варианты ЯЧ и ОВ также существенно отставали по скорости обрастания зерна от остальных вариантов на этапе приготовления мицелия и обрастания компоста. Агрохимический анализ не показал зависимости скорости обрастания зерна от содержания в нем азота (минимальное 1,60% у РЖ и максимальное 2,25% – у ПШ).

Таким образом в результате исследования удалось установить оптимальные виды зерна ПШ и РЖ для производства мицелия *A. bisporus*. Показано, что вид зерна не влияет на общую урожайность гриба шампиньона, но оказывает влияние на скорость роста мицелия и качество плодовых тел. Показатель урожайности зависит, главным образом, от качества компоста. Это дает дальнейшие перспективы для получения качественного мицелия, но подтверждает, что необходимо рассматривать совместно в технологии показатели качества мицелия и компоста.

ФОТОРЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Поединок Н.Л., Ефременкова О.В., Михайлова О.Б.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины

НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе РАМН

Москва – Киев

Известно, что свет является одним из морфогенетических факторов роста и развития многих видов культивируемых грибов. Однако, он до сих пор не нашел практического применения в биотехнологиях промышленного культивирования высших грибов, которые являются продуцентами многих лекарственных веществ. Это объясняется тем, что механизмы фоторецепции у грибов в настоящее время изучены недостаточно. Сейчас преобладает эмпирический подход к разработке методов светового воздействия на грибы. Это связано с отставанием теоретического и экспериментального обоснования механизма взаимодействия низкоинтенсивного излучения с грибным организмом. Тем не менее, практическое использование света в биотехнологических процессах возможно даже в отсутствии общепринятых выводов о механизмах его действия (естественно, выяснение механизмов многократно усилило бы эффективность), но при условии тщательного исследования спектра действия, наиболее эффективных длин волн, режимов облучения. Как показали наши исследования и работы других ученых грибы неодинаково ведут себя под влиянием света. Нами проводятся исследования влияния низкоинтенсивного видимого света разной длины волны (когерентного и некогерентного) на рост и биосинтетическую активность разных видов высших грибов, обладающих лекарственными свойствами. Особое место среди них занимают пигмент содержащие штаммы *Inonotus obliquus* и *Laetiporus sulphureus*. Изучено влияние света в видимой части спектра на рост и биосинтетическую активность *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Laetiporus sulphureus* и *Hericium erinaceus* и определено, что облучение в определенных режимах стимулирует мицелиальный рост, сокращает фазы развития грибов, способствует формированию более мощного и активного мицелия и увеличивает урожайность плодовых тел. Активация посевного мицелия путем облучения позволяет снизить дозу его внесения в субстрат в два раза. В настоящее время усилия исследователей и разработчиков направлены на поиск научно-технических решений, позволяющих достигнуть более высоких экономических показателей при получении биомассы лекарственных грибов и создание конкурентно способных фармакологических препаратов и средств. Суть решения этой задачи состоит в использовании глубинного метода выращивания лекарственных грибов. Анализируя динамику накопления биомассы, мы обнаружили, что облучение посевного мицелия приводит к сокращению лаг-фазы и увеличению скорости роста культуры. Проведено изучение влияния света разной длины волны на биосинтез полисахаридов (*G. lucidum*, *L. edodes* and *H. erinaceus*), меланинов (*I. obliquus*), каротиноидных пигментов (*L. sulphureus*) и антимикробную активность *P. ostreatus*. Облучение синим и красным светом посевного мицелия *G. lucidum*, *L. edodes* и *H. erinaceus* увеличивало накопление ими полисахаридов на 40-64%. Максимум накопления меланинов *I. obliquus* отмечался при воздействии на него синего света - 10,5 г/л (в контроле – 6,05 г/л), а максимум увеличения биомассы и накопления каротиноидных пигментов *L. sulphureus* – при облучении красным светом. Это подтверждает теорию о некотором различии фоторегуляторных систем у меланин- и каротинсодержащих грибов: у грибов синтезирующих каротиноидные пигменты она ближе к фитохромным системам высших растений.

ПЕРСПЕКТИВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЦЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ *CORDYCEPS MILITARIS* И *CORDYCEPS SINENSIS*.

Поединок Н.Л. ¹, Бисько Н.А. ¹, Бабицкая В.Г. ², Пучкова Т.А. ², Михайлова О.Б. ¹

¹ – Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины

² – Институт микробиологии имени Купревича НАН Белоруссии

Киев – Минск

Грибы рода *Cordyceps* относятся к энтомопатогенным сумчатым грибам из порядка *Clavicipitales*. Это большой космополитный род, характеризующийся образованием перитециев и содержащий, по разным источникам, от 200 до 350 видов. Многие виды этого рода обладают лекарственными свойствами. Особый интерес представляют *C. militaris* и *C. sinensis*. В настоящее время большую популярность приобретает многовековой опыт традиционной Китайской медицины, символом которой является Женьшень. Однако среди европейцев мало кто знает, что рядом с этим растением в первой шеренге по целительным свойствам находится именно *Cordyceps sinensis*. В народной китайской медицине на протяжении тысячелетия используют как стромы грибов, так и гусеницы бабочек, заполненные мицелием. Ткани насекомых, убитых кордицепсами, не заселяются бактериями и не разлагаются в течение длительного времени. Это связано с образованием грибом антибиотика кардиципина, выделяемого в ткани хозяина и защищающего субстрат от заселения микроорганизмами. История применения кордицепса в самом Китае насчитывает более 1200 лет. В последние годы *Cordyceps militaris* все чаще фигурирует в литературе, как объект, представляющий интерес в фармакологии (Ванг, Шиао, 2000). В США и Европе успешные исследования детально проверяются и лучшие защищаются патентами на изобретения. По данным U.S. Patent & Trademark Office (USPTO) на начало 2002 года в США были выданы 11 патентов на применение кордицепса с целью оздоровления, 4 изобретения касались способов культивирования мицелия этого гриба. Согласно данным Европейского патентного бюро было выдано 34 патента на применение кордицепса для оздоровления и 36 по способам культивирования (European Patent Office).

Сборы кордицепса в природных условиях весьма ограничены и является процессом сезонным и трудоемким. Поэтому такой материал остается редким и очень дорогим. Промышленное производство биологически активных добавок на основе кордицепса диктует необходимость разработки современных интенсивных технологий культивирования этих грибов в искусственных условиях. Широкое распространение получили препараты мицелия различных штаммов гриба, которые культивируют на зерне риса и других злаков. Однако, содержание активных веществ, полученных при этом способе культивирования гриба, не может быть значительным. Поэтому представляется перспективным разработка технологий глубинного культивирования этих грибов.

Нами определены оптимальные параметры глубинного культивирования *C. militaris* и *C. sinensis*. Установлено, что максимальный выход биомассы и полисахаридов наблюдались при pH 4-7 и при температуре 20-25⁰ С, при использовании в качестве источников углерода - глюкозы, лактозы и сахарозы, а в источников азота - фосфата аммония, пептона и дрожжевого экстракта. Добавление растительных масел стимулировало ростовые процессы и обеспечивало одновременно высокий выход биомассы, липидов, фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот, а также каротиноидов. Световая обработка посевного инокулюма позволила в несколько раз снизить его внесение в ферментационную среду и сократить длительность процесса культивирования.

Работа выполнялась при поддержке Государственных Фондов Фундаментальных Исследований Украины и Белоруссии.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ СУБСТРАТА, ИНОКУЛИРОВАННОГО ТЕРМОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ НА ЕГО СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ВЕШЕНКИ

Прудникова С. В., Малиновский А. Л.

Сибирский федеральный университет

Красноярск

Одной из проблем при выращивании съедобных грибов является создание селективных субстратов, на которых подавляется рост конкурирующих микроорганизмов – бактерий и плесневых грибов. С этой целью проводится термообработка субстрата в сочетании с ферментацией защитной микрофлорой – бактериями из группы *Bacillus subtilis*. Факторами селективности такого субстрата являются антибиотические вещества, выделяемые в период ферментации, а также косвенное влияние, оказываемое защитной микрофлорой на конкурентные микроорганизмы за счет подщелачивания среды и потребления легкодоступных сахаров и аммонийного азота. Данный способ обработки субстрата получил наибольшее распространение при выращивании грибов рода *Pleurotus*. В работе исследовали эндогенную микрофлору субстрата после ферментации при температуре 55 °С в течение 3-х суток и выделили ряд изолятов термотолерантных (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Thermomonospora mesophila*) и термофильных (*Bacillus stearothermophilus*, *Pseudonocardia thermophila*, *Thermomonospora chromogena*, *Thermoactinomyces sp.*) бактерий. По результатам исследования антагонистических свойств были отобраны изоляты, обладающие наибольшей активностью в отношении конкурентных плесневых грибов, доминирующих в данном субстрате и не подавляющихся в процессе высокотемпературной ферментации. Однако оказалось, что наиболее активные виды (*B. subtilis* 05, *B. subtilis* 07, *T. mesophila* 03) в некоторой степени подавляли развитие мицелия вешенки во встречных культурах, поэтому в дальнейших экспериментах исследовали термофильные виды бактерий.

Среди термофилов проводили скрининг по способности активно заселять субстрат. В результате были отобраны быстрорастущие изоляты (*B. stearothermophilus* 01 и *P. thermophila* 04) и далее оценивалась их способность стимулировать рост и развитие вешенки. Культивирование вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus* НК-35) проводили интенсивным методом на уплотненной соломе, предварительно измельченной и пастеризованной. Субстрат с остаточной влажностью 65-70%, инокулировали суспензией культуры термофильных бактерий с титром $1 \cdot 10^6$ из расчета 1 мл на 100 г субстрата и ферментировали при температуре 55 °С в течение 3-х суток. В контрольном варианте проводили ферментацию без дополнительного внесения термофильных бактерий.

Эксперименты показали, что при высокотемпературной ферментации с использованием термофильных изолятов бактерий селективность субстрата усиливается. Так, в контрольном варианте в трех блоках был отмечен рост плесневых грибов: *Penicillium* – в одном блоке, и *Trichoderma* – в двух блоках. В опытных вариантах рост конкурентной микрофлоры не наблюдали. Оценка действия термофильных бактерий на рост мицелия вешенки и развитие ее плодовых тел показала, что оба исследуемых изолята оказывали стимулирующий эффект. В опытных вариантах отмечали раннее образование примордиев – на 5-7 суток в сравнении с контролем. Однако скорость созревания плодовых тел во всех вариантах опыта достоверно не различалась и составляла 5-7 суток. Биомасса плодовых тел в опытных вариантах превышала контрольную на 26,5-35,2 %.

Таким образом, было установлено, что использование выделенных изолятов защитной термофильной микрофлоры для высокотемпературной ферментации субстрата позволяет усилить селективность субстрата, обеспечивает надежную защиту от конкурентных плесневых грибов, а также стимулирует образование и рост плодовых тел грибов вешенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке ККФН, грант 11F0171М.

СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТОВ С ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Пужевская Т.О., Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Борисова Н.А., Катлинский А.В.

НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова

ФГУП "Государственный научный центр по антибиотикам"

Московская медицинская академия имени И.М.Сеченова

Москва

При развитии атеросклероза наблюдается отложение холестерина в субинтимальное пространство артериальной стенки. При свободнорадикальном окислении происходит модификация структуры ЛПНП, вследствие чего они приобретают большую атерогенность и усиленно захватываются макрофагами стенки сосудов. Защита ЛПНП от окисления осуществляется в основном восстановленной формой убихинона Q₁₀ – убихинолом Q₁₀. Установлено, что статины блокируют синтез холестерина на уровне образования мевалоновой кислоты, попутно подавляя синтез других биологически активных субстанций, в том числе и убихинона. Учитывая роль окислительного стресса в патогенетических механизмах развития атеросклероза перспективным представляется скрининг природных соединений комплексного действия – нормализующих уровень липидов в организме и снижающих уровень свободно-радикальных процессов.

Нами были отобраны микромицеты, проявляющие выраженную гиполипидемическую активность *in vitro* (клетки гепатоцитов Hep G2) и *in vivo* (кролики). Представляло интерес оценить антиоксидантную активность отобранных соединений.

Антиоксидантные свойства отобранных экстрактов изучали с помощью модельной системы Fe²⁺-аскорбат индуцируемого перекисного окисления липидов (ПОЛ) фосфолипидных липосом, полученных из яичных желтков. Анализ накопления продуктов ПОЛ проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой. При исследовании 15 экстрактов из мицелия микроорганизмов, проявляющих гиполипидемическую активность, на наличие АОА были отобраны 3 наиболее активных препарата, продуцируемые микромицетами *Lecanicillium* sp.169, *Beauveria* sp. 162, *Beauveria* sp. 164. Из этих препаратов были получены чистые фракции, которые в концентрации 100-150 мкг/мл, подавляли ПОЛ на 70-80%. Контрольный препарат α-токоферол проявлял аналогичную активность в концентрации 500 мкг/мл.

Эти же экстракты были исследованы методом разработанным Nishimiki et al. для соединений, проявляющих АОА в гидрофильных условиях. Метод основан на восстановлении нитросинего тетразолия в присутствии НАДН, активированного феназинметасульфатом. При оценке этим методом указанные выше соединения в концентрации 100-150 мкг/мл проявляли прооксидантные свойства. Для проявления АОА требовались дозы в 3-4 раза более высокие. При оценке активности других экстрактов, был отобран препарат выделенный из культуральной жидкости *Acremonium* sp.25, снижающий оксидацию на 86% в концентрации 5 мкг/мл. В качестве контроля использовали известный антиоксидант астин, ингибирующий окислительный процесс на 72% в концентрации 5 мкг/мл. Представленные результаты характеризуют вещество, продуцируемое культурой №25 как ингибитор образования супероксид анионных радикалов.

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНЫХ ФРАКЦИЙ ГРИБОВ

Пучкова Т.А., Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Осадчая О.В., Черноок Т.В., Иконникова Н.В., Филимонова Т.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси

Минск

Липиды являются многокомпонентной системой, в состав которой входят не только природные антиоксиданты, ответственные за антиокислительные свойства липидов, но и вещества, способные легко образовывать природные радикалы и инициировать процессы окисления. Таким образом, величина антиокислительной активности липидов является суммарной характеристикой и обусловлена действием всей суммы природных антиоксидантов. Целью работы явилось определение антиокислительной активности общих липидов и отдельных их фракций грибов *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus* и *Cordyceps militaris*. Показано, что грибы *G. lucidum*, *L. sulphureus* и *C. militaris* содержат значительное количество липофильных антиоксидантов. Антиокислительная активность их общих липидов достигала 97% антиокислительной активности известного антиоксиданта ионола.

Для базидиомицетов *G. lucidum* и *L. sulphureus* антиокислительная активность суммарных липидов была выше, чем активность отдельных фракций. Из фракций большей способностью препятствовать перекисному окислению липидов обладали полярные липиды. У *C. militaris* наибольшей антиоксидантной активностью обладала фракция нейтральных липидов. Изучение антиокислительной активности компонентов нейтральных липидов *C. militaris* показало, что слабой антиоксидантной активностью обладали свободные жирные кислоты и триацилглицерины. Данное явление, вероятно, можно объяснить тем, что триацилглицерины и жирные кислоты, окисляясь, замедляли окисление линолевой кислоты, используемой в качестве индикатора перекисного окисления. Проксидантной активностью обладали эфиры стеринов, неидентифицированная фракция липидов с $R_f = 0,167$ и эргостерин. Проксидантная активность установлена для аналогичных фракций нейтральных липидов базидиальных грибов *G. lucidum* и *L. sulphureus*. В то же время свободные жирные кислоты и триацилглицерины этих грибов проявили незначительную антиоксидантную активность. Исследование антиокислительной активности 3-х фракций полярных липидов показало, что наибольшей активностью у всех грибов обладает фосфатидилхолин, наименьшей – кардиолипин. Отличительной особенностью *L. sulphureus* является накопление в значительных количествах – до 5,5 % – ярко оранжевого пигмента, который был идентифицирован и отнесен к каротиноидным пигментам и назван латипороксантином. На протяжении многих лет латипороксантин был признан основным каротиноидным пигментом гриба. В последние годы появилось иное мнение, согласно которому в основном пигменте *L. sulphureus* преобладают две фракции (M_r 420 и M_r 402), относящиеся к группе полиеновых кислот: латипоровая кислота А и 2-дегидро-3-диоксилатипоровая кислота. Для установления антиоксидантной активности получены 3 фракции пигмента, различающиеся по степени полярности: нейтральная – 6,6 % от суммы пигментов, полярная – 87 % от суммы пигментов, среднеполярная – 6,4 % от суммы пигментов. Наибольшей антиокислительной активностью обладала нейтральная фракция пигмента – до 98% от ионола. Несколько меньшая активность отмечена у полярной и среднеполярной фракций пигмента гриба – 72% и 55 % от ионола соответственно. Исследование антиокислительной активности спиртовых экстрактов мицелия и липидов ксилотрофных базидиомицетов и аскомицета дает основание полагать, что она обусловлена присутствием в грибах низко- и высокомолекулярных фенольных и липофильных соединений, в т.ч. пигментов, нейтральных и фосфолипидов.

Таким образом, грибы располагают как средствами антиоксидантной защиты, так и обладают способностью инициировать реакции перекисного окисления липидов. Баланс

этих процессов устанавливает интенсивность перекисного окисления липидов на определенном стационарном уровне.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ α -L-РАМНОЗИДАЗ *PENICILLIUM COMMUNE* 266 В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Рзаева О.Н., Варбанец Л.Д

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины имени Д.К. Заболотного
Киев, Украина

α -L-Рамнозидаза (α -L-рамнозид-рамногидролаза, К.Ф. 3.2.1.40) – фермент, высокоспецифичный к терминальным остаткам L-рамнозы, присутствующей в природных гликоконъюгатах и синтетических гликозидах. Его используют в пищевой промышленности для обезжаривания грейпфрутовых соков путем модификации горького компонента – нарингина, для удаления кристаллов гесперидина из апельсиновых соков. α -L-Рамнозидазу применяют для улучшения ароматов вин и ферментативного гидролиза натуральных гликозидов. Для данных процессов важным является использование ферментов, стабильных при высоких температурах. Поскольку известно, что ингибирование фермента высокими концентрациями продуктов реакции ограничивает скорость реакции и выход продуктов гидролиза, целью работы было изучить влияние глюкозы и этанола, присутствующих в цитрусовых соках и винах, а также физико-химические условия, которые могут повлиять на активность препаратов α -L-рамнозидазы 1 и 2, полученных нами ранее из *Penicillium commune* 266. Установлено, что термо- и pH-оптимумы гидролиза ферментами *n*-нитрофенильного субстрата составляют 60 °С и 4,0-4,2 соответственно. Препараты стабильны в диапазоне температур 0-20 °С, pH 3,0-6,0, устойчивы при хранении. Обе α -L-рамнозидазы проявляли большее сродство к натуральным субстратам – нарингину и неогесперидину (K_m для α -L-рамнозидазы 1 1,7 мМ (нарингин) и 1,6 мМ (неогесперидин); V_{max} 15,0 и 16,3 моль/мин/мг белка; для α -L-рамнозидазы 2 K_m 1,32 мМ (нарингин) и 1,95 мМ (неогесперидин); V_{max} 17,8 и 30,7 моль/мин/мг белка). При гидролизе *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозида K_m составляла 2,97 и 2,81 мМ, V_{max} 33,9 и 11,0 мкмоль/мин/мг белка, для α -L-рамнозидаз 1 и 2 соответственно. При помощи метода Лайнуивера-Берка установлено, что L-рамноза ингибирует активность обоих препаратов по конкурентному типу. Константы ингибирования (K_i) продуктом реакции составляли соответственно $7,25 \times 10^{-3}$ М и $7,0 \times 10^{-3}$ М для α -L-рамнозидазы 1 и 2. Эти данные превышают константу Михаэлиса (K_m) для *n*-нитрофенильного и натуральных субстратов, т.е. $K_m < K_i$. При таком соотношении кинетических констант фермент работает продуктивно, при этом скорость гидролиза субстрата определяется скоростью образования фермент-субстратного комплекса.

Для исследования возможности применения ферментных препаратов в пищевой промышленности, проверяли влияние глюкозы (концентрация 20%) и этанола (концентрация 25%) на активность ферментов: глюкоза снижала активность α -L-рамнозидазы 1 на 47 %, а α -L-рамнозидазы 2 – на 80 %. Этанол полностью инактивировал α -L-рамнозидазу 2 и на 50 % снижал активность α -L-рамнозидазы 1.

Таким образом, исследованы свойства высокоспецифичных α -L-рамнозидазы 1 и 2 из *P. commune* 266, которые проявляют значительное сродство к натуральным субстратам, обладающих значительным уровнем активности, и стабильными физико-химическими характеристиками при физиологических и технологических условиях.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНДУКТОРОВ НА СИНТЕЗ ЛАККАЗЫ ПРОМЫШЛЕННЫМ ШТАММОМ *TRAMETES HIRSUTA* CF-28

Русинова Т.В., Сальцова И.Ю., Батуринец А.А., Закирова Л.Р., Горшина Е.С.

Московский государственный университет инженерной экологии

Москва

Штамм базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen.) Pilát CF-28 (сем. Poliporaceae) характеризуется высокой скоростью роста, активным синтезом экстрацеллюлярной лакказы в условиях жидкофазного глубинного культивирования и используется в качестве штамма-продуцента в промышленной технологии производства лакказы – фермент класса оксидоредуктаз (КФ 1.10.3.2 п-дифенол: кислород оксидоредуктаза), катализирующего окисление широкого круга субстратов молекулярным кислородом с сопутствующим восстановлением последнего до воды. Каталитические и электрокаталитические свойства лакказы дают возможность (в присутствии соответствующих редокс-медиаторов) ее широкого использования в различных областях промышленности, в частности в органическом синтезе; для биodeградации ксенобиотиков; детоксикация и обесцвечивания сточных вод; получение древесноволокнистых плит; текстильной промышленности; кожевенном производстве; косметической промышленности; при создании антимикробных композиций и в других областях.

На среде оптимизированного состава изучена возможность увеличения оксидазной активности в культуральной жидкости *Trametes hirsuta* CF-28 за счет введения в состав среды веществ, известных как индукторы синтеза лакказы. Опыты проводили в колбах на качелке. В качестве индукторов использовали таниновую кислоту, сиригальдазин, кофейную кислоту, вератриловый спирт, 2,6-диметоксифенол, этанол, а также лигнинсодержащие отходы: дубовый лигнин, древесные стружки, подсолнечную лузгу, виноградные гребни, костру льна.

Показано, что внесение в среду этанола оказывает индуцирующее действие на синтез лакказы. Максимальная оксидазная активность повышалась в 1,5 раза. Внесение в том же количестве этанола вератрилового спирта, кофейной кислоты, сиригальдазина и таниновой кислоты в количествах и условиях нашего опыта не оказывало существенного влияния, тогда как 2,6-диметоксифенол проявлял ингибирующее действие. Оксидазная активность в его присутствии была на 40 % ниже оксидазной активности в присутствии чистого этанола и соответствовала активности в контроле.

Среди лигнинсодержащих субстратов максимальная оксидазная активность наблюдалась на среде с древесными стружками и виноградными гребнями и соответствовала оксидазной активности при внесении этанола. Однако продуктивность по оксидазной активности на среде с древесными стружками составляла $8,1 \text{ ME} \cdot \text{сут}^{-1}$, в то время как на среде с этанолом $4,7 \text{ ME} \cdot \text{сут}^{-1}$ при $5,5 \text{ ME} \cdot \text{сут}^{-1}$ в контроле.

Использование в качестве индуктора костры льна в оптимальном количестве, степени измельчения и способе внесения в среду существенно повышало оксидазную активность в культуральной жидкости. Максимальная оксидазная активность превышала контрольную в 3,2 раза и составляла 78 ME. Продуктивность увеличилась до $14,9 \text{ ME} \cdot \text{сут}^{-1}$.

ГРИБНЫЕ ЭКСТРАКТЫ, КАК КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Ряпис О.В., Петров А.Н.

Иркутский государственный медицинский университет»

Иркутский государственный университет

Иркутск

По аминокислотному составу как съедобные, так и несъедобные грибы имеют много общего с мясными продуктами, которые обычно используются для приготовления селективных питательных сред при культивировании патогенных микроорганизмов. Более того, в природных условиях близкие виды патогенов нередко питаются либо животными (преимущественно, насекомыми), либо грибами. Характерным примером могут служить трофические связи представителей рода *Cordyceps*.

Для исследования нами были взяты свежие и высушенные грибы, собранные в окрестностях Иркутска. Пока апробированы лишь некоторые типичные представители порядка Agaricales s.l. из родов *Collybia*, *Clitocybe*, *Agaricus*, *Pholiota*, *Russula*, *Lactarius*.

Измельченную грибную массу настаивали (24 и 48 час.) на дистиллированной воде, либо кипятили (10 и 20 мин.), а затем полученные экстракты агаризовали для получения плотной питательной среды. В ходе опытов в среды, кроме агара, добавляли и некоторые дополнительные компоненты (солевые растворы, витамины, АТФ, глицерин и глюкозу). Среды стерилизовали автоклавированием в стандартных режимах.

Чувствительность грибной агаризованной среды изучали путем посева на пластинчатый агар 10 и 100 КОЕ (по бактериальному стандарту мутности) двухсуточной культуры вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА.

В качестве контрольных сред использовали стандартный эритрит-агар, рекомендуемый для культивирования бруцелл, а также среды на основе свиного и куриного бульона.

Полученные результаты показали, что грибная агаризованная среда является хорошим питательным субстратом для роста *B. abortus* 19 ВА. При посевной дозе 10 КОЕ наблюдался рост 3-7 колоний, при посевной дозе 100 КОЕ - 34-100 колоний бруцелл.

Рост отмечен на средах всех испытанных вариантов, в том числе на нативной и при включении в нее дополнительных ингредиентов. Есть основания полагать, что при соответствующем подборе компонентов на основе грибных экстрактов можно получить питательные среды для культивирования не только возбудителя бруцеллеза, но и некоторых других патогенных микроорганизмов.

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ И РОСТСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ РОДОВ *TRICHODERMA* И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОКОНТРОЛЕ

Садыкова В.С.¹, Третьякова И.Н.², Носкова Н.Е.² Бондарь П.Н.¹.

¹ – Сибирский государственный технологический университет

² – Институт леса СО РАН

Красноярск

Многолетними исследованиями показано, что основным сдерживающим фактором развития фитопатогенов является антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma* и актиномицетов. Из лесных почв и агроценозов выделено более 200 штаммов различных видов грибов рода *Trichoderma* и актиномицетов. Выявлена гетерогенность популяций видов рода *Trichoderma* по гиперпаразитической и антибиотической активности и культурально-морфологическим свойствам.

В результате исследований отобраны антагонистически активные и высокопродуктивные штаммы *Trichoderma asperellum* МГ-97 (F-765), *T. asperellum* МГ-6 (ВКПМ F-878), *T. asperellum* К-12 (ВКПМ F-887), *T. harzianum* Th 5 (ВКПМ F-888) и *T. citrinoviride* Th 4 (ВКПМ F-889). Изучение закономерностей роста и спорообразования позволило определить основные показатели продуктивности штаммов и разработать условия получения споровой формы многокомпонентного биологического препарата триходермин, содержащего высокий титр спор ($1,5-2,5 \times 10^{10}$ на 1 г препарата).

При исследовании действия выделенных штаммов рода *Trichoderma* на злаках и овощных культурах установлено, что помимо прямой защиты от действия фитопатогенов, они индуцируют системную и локальную резистентность растения, а также выделяют элиситоры, оказывающие ростостимулирующий эффект. В многочисленных исследованиях было показано, что антагонистически активные штаммы рода *Trichoderma* способны прямо увеличивать скорость роста различных растений путем контроля вредных непатогенных корневых микроорганизмов, разрушать токсичные метаболиты и подавлять рост патогенов в ризосфере и ризоплане.

Дальнейшим этапом исследований была оценка ростостимулирующей активности штаммов из родов *Trichoderma* и возможности их использования для разработки биотехнологии микрклонального размножения элитных хвойных культур. В качестве эксплантов использовали незрелые зиготические зародыши плюсовых элитных деревьев-доноров лиственницы сибирской, лиственницы даурской, сосны сибирской и кедрового стланика.

Установлено ростостимулирующее действие метаболитов грибов рода *Trichoderma* на образование эмбрионного каллуса (эмбрионально – суспензорная масса (ЭСМ)) и рост зародышей. Метаболиты штаммов способны прямо увеличивать скорость роста каллусов и зародышей хвойных растений. Однако, действие метаболитов на растительный организм видоспецифично. Объекты (эксплант, пролиферирующий каллус, зародыши) каждого вида избирательно реагировали на метаболиты грибов рода *Trichoderma*. Обработка метаболитами штаммов рода *Trichoderma* увеличивает прорастание изолированных зародышей сосны сибирской и лиственницы сибирской в культуре *in vitro*. При обработке каллусов лиственницы даурской наибольший стимулирующий эффект оказали метаболиты штамма М99/5, обработка другими метаболитами изучаемых штаммов грибов не оказывала достоверного влияния на интенсивность прироста каллуса. Неоднозначность действия метаболитов согласуется с данными других исследователей, показавших существенные различия по увеличению массы у разных видов и сортов злаковых растений и в ответных реакциях на воздействие отдельных видов *Trichoderma*.

Проведенные исследования дают основание сделать вывод о том, что применение биоконтрольных штаммов в плантационном лесовосстановлении для стимуляции роста каллусов и зародышей и получения растений-регенерантов хвойных, устойчивых к

заболеваниям, будет способствовать развитию нового направления в лесной науке в России – «клонального лесоводства».

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗ МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Костеневич А.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси

Минск

β -Галактозидаза (лактаза, β -D-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует реакции гидролиза и трансгликозилирования β -галактозидов, в том числе лактозы, с образованием соответственно β -D-галактозы и ее олигомеров. Указанные свойства фермента определяют его широкое использование в пищевой и фармацевтической промышленности для производства безлактозных молочных продуктов, глюкозо-галактозных сиропов, галактоолигосахаридов, лекарственных препаратов [Panesar P.S. et al., 2006]. Конкуренция в сфере производства и применения препаратов β -галактозидазы оправдывает все возрастающие усилия ученых и производителей, направленные на поиск новых штаммов-продуцентов, изучение закономерностей биосинтеза ферментов и свойств ферментных белков – основы создания рентабельных биотехнологий их производства и применения.

В результате проведенного ранее двухступенчатого скрининга из мицелиальных грибов, представленных в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, для дальнейшей работы отобраны следующие синтезирующие внеклеточные бета-галактозидазы штаммы: *Aspergillus alliaceus* НММ II-67, *A.alliaceus* НММ III-9, *A.nutans* F-65, *Penicillium canescens* 95/8, *P.chrysogenum* F-99, *P.crustosum* F-158, *P.jensenii* и *P.variabile* 12200 [Тамкович И.О. и соавт., 2008]. В задачу настоящего исследования входила оценка бета-галактозидазной активности указанных грибов в зависимости от условий их культивирования.

Установлено, что, несмотря на широкий спектр утилизируемых источников углеродного питания, исследованные штаммы для синтеза бета-галактозидаз нуждаются в индукторе – лактозе, являющейся природном специфическим субстратом фермента. Сравнимый с лактозой индуцирующий эффект на образование грибами ферментов, имеющих внеклеточную локализацию и гидролизующих специфический субстрат предпочтительно в кислой среде, оказывает также содержащая этот дисахарид молочная сыворотка. Выявлено репрессивное влияние глюкозы на образование фермента исследованными продуцентами. Показано, что активному синтезу бета-галактозидаз способствуют условия повышенной кислотности питательной среды, которые обеспечиваются добавлением в питательные среды для выращивания грибов физиологически кислых источников азота – аммонийных солей серной и азотной кислоты.

На основании полученных данных в качестве перспективных продуцентов β -галактозидазы отобраны штаммы *P. jensenii* и *P. chrysogenum* F-99.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* И ОБРАЗОВАНИЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Семашко Т.В., Михайлова Р.В., Жуковская Л.А., Лобанок А.Г.

Институт микробиологии НАН Беларуси

Минск

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4), фермент класса оксидоредуктаз, катализирует окисление β-D-глюкозы до β-D-глюконо-δ-лактона и перекиси водорода. Она используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта, в химической – для производства глюконовой кислоты и глюконатов. Фермент также необходим для определения глюкозы в клинических, фармакологических, химических анализах и в биосенсорных технологиях.

Ранее нами методом индуцированного мутагенеза получен высокоактивный продуцент глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* 46.1. В настоящее время в ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» разрабатывается технология производства ферментного препарата Глюкозооксидаза, одним из этапов которой является оптимизация параметров культивирования штамма.

Цель исследований – анализ влияния условий культивирования и на рост *P. funiculosum* 46.1 и образование внеклеточной глюкозооксидазы в лабораторных ферментерах АК-3 и АК-30.

Влияние интенсивности аэрации на рост *P. funiculosum* 46.1 и образование глюкозооксидазы изучали при механическом перемешивании питательной среды со скоростью 100 об/мин, используя различные режимы подачи воздуха (0-2,0 л/л мин). Установлено, что при использовании только механического перемешивания питательной среды рост *P. funiculosum* 46.1 практически отсутствует. С увеличением скорости подачи воздуха (0,5-1,5 л/л мин) усиливается накопление биомассы грибом и повышается уровень биосинтеза фермента. Максимальное образование глюкозооксидазы (17,6±0,9 ед/мл) *P. funiculosum* 46.1 отмечено при использовании для аэрирования питательной среды 1,5 л/л·мин воздуха. Дальнейшее повышение скорости подачи воздуха до 2 л/л·мин приводит к увеличению накопления биомассы грибом (до 5,0 мг/мл), но уровень синтеза глюкозооксидазы при этом снижается на 47%.

Изучение влияния интенсивности механического перемешивания питательной среды на биосинтез глюкозооксидазы *P. funiculosum* 46.1 проводили при изменении скорости вращения мешалки (50, 100, 150 об/мин) при подаче воздуха со скоростью 1,5 л/л·мин. Анализ полученных результатов показал, что барботирование среды без механического перемешивания приводит к торможению роста продуцента и снижению уровня образования фермента. Оптимальные условия для роста гриба и синтеза глюкозооксидазы достигнуты при перемешивании питательной среды со скоростью 100 об/мин (ферментер АК-30) и 150 об/мин (ферментер АК-3). Образование фермента в этом случае достигает 17,7-18,1 ед/мл, а продуцирующая способность мицелия – 4,5-4,8 ед/мг.

При исследовании влияния температуры на рост гриба и продуцирование внеклеточной глюкозооксидазы показано, что *P. funiculosum* 46.1 хорошо растет в интервале температур 22-26°C. Максимальный уровень образования фермента отмечен при культивировании гриба при 24-25°C. С увеличением температуры выращивания до 28-30°C происходит снижение уровня биосинтеза глюкозооксидазы *P. funiculosum* 46.1 на 50-78%.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов оптимизированы параметры культивирования *P. funiculosum* 46.1 - продуцента глюкозооксидазы в лабораторном ферментере. Оптимальной температурой культивирования *P. funiculosum* 46.1 является 24-25°C, а лучший режим аэрации обеспечивается перемешиванием питательной среды с использованием мешалки со скоростью вращения 100-150 об/мин и барботированием 1,5 л/л·мин воздуха.

АНТИИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ БИОПОЛИМЕРОВ ИЗ FOMES FOMENTARIUS

Сенюк О.Ф.¹, Горовой Л.Ф.², Рытик П.Г.³, Кучеров И.И.³, Прилуцкая А.Б.⁴

1 – Институт проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины

2 – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

3 – Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

*4 – Национальный медицинский университет имени О.О. Богомольца, Украина, Киев
Чернобыль – Киев – Минск*

При лечении разных инфекционно-воспалительных заболеваний в качестве противоинфекционных средств традиционно используются антибиотики (АБ), мишенями для поражающего влияния которых, кроме микроорганизмов (МО) выступают определенные ключевые процессы обмена в клетках организма-хозяина, обуславливая развитие различных осложнений и манифестацию синдрома эндогенной интоксикации.

В *in vitro* условиях на эталонных штаммах *Helicobacter pylori* (VaccA – M.C.T.C, Лондонская Международная Коллекция), вируса обычного герпеса (штамм ВПГ-1, УС Государственной коллекции РАМН), высокорепликативного штамма ВИЧ-1_{zmb}, конидиях культуры грибов рода *Candida* (ВКПГУ –1006/1869 из НИИ медицинской микологии им.П.Н.Кашкина Санкт-Петербургской академии последиplomного образования) изучали антиинфекционное действие меланин-глюканового комплекса из высших грибов (МГК). Использовали различные концентрации (0.1, 1.0, 10.0 и 100 мкг/мл) антибиотиков (пенициллин, амоксициллин, гентамицин, амнициллин, канамицин, рифампицин, эритромицин, аугментин, метронидазол, ванкомицин, сульфодиметоксин, триметаприм), фунгицидных (амфотерицин-β, леворин, нистатин, римафуцин, дактарин, низорал, дифлюкан, медрофлюкан) и антивирусных (алпизарин, амиксин, гропринозин, изопринозин, медовир, герпевир, зовиракс ганцикловир и вальтрекс) препаратов, а также водорастворимого МГК. Во всех случаях исследования базировались на результатах так называемой терапевтической схемы контроля (испытываемые препараты вносились в культуральную среду одновременно с инфектом).

Показали, что МГК обладает одновременно сильной антибактериальной, антивирусной и антимикотической активностью, в ряде случаев, превышающей аналогичную активность фармакопейных препаратов.

Результаты клинической апробации МГК у 87-ми больных в возрасте от 24 до 75 лет в гнойно-септических заболеваниях (нагноение п/о раны, трофические язвы, флегмоны, абсцессы различных локализаций) показали высокую клиническую эффективность его, что проявилось значительным уменьшением интоксикации, признаков местного воспаления, положительной динамикой клинико-лабораторных показателей. Аппликационная терапия МГК значительно снижает обсемененность в ране до минимального уровня (10^2 - 10^3 мо/г), ускоряет переход фазы гидратации в фазу дегидратации, что позволяет сократить пребывание больного в условиях стационара на 5-7 дней, а также предупредить развитие возможных гнойно-септических осложнений.

Учитывая отсутствие у МГК токсических свойств на клетки крови даже в очень высоких концентрациях, предлагается его рекомендовать в качестве источника биополимеров для создания принципиально новых средств для широкого применения при инфекционной патологии, в том числе и при инфекционных осложнениях различного генеза.

ЛИПИДЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КАК НОВОЕ БИОТОПЛИВО

Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Феофилова Е.П.

Институт микробиологии имени С.Н.Виноградского РАН

Москва

В настоящее время энергетика человечества почти на 80% основана на использовании ископаемого топлива – нефти (до 35%), угля (около 46%) и газа (около 20%), при этом такие виды широко используемого моторного топлива как дизельное топливо и бензин полностью получают из нефти. На данный момент мощным экономическим фактором, обуславливающим активное развитие и становление альтернативной биотопливной индустрии, являются высокие цены на нефть. Одним из возможных решений этой проблемы является использование возобновляемых источников энергии. В настоящее время в качестве моторного топлива широко используется биоэтанол (США) и биодизель (Европа).

Биодизельное топливо, биодизель – это сложные эфиры (чаще всего метиловые) жирных кислот. По своим техническим характеристикам биодизель близок к параметрам дизельного топлива, полученного из нефти. На данный момент в качестве исходного сырья используют растительные масла. Массовое производство биодизеля из масел сельскохозяйственных растений приводит к конкуренции за сырье с производством продуктов питания. В течение нескольких последних лет все большее внимание стали уделять развитию микробиологического получения биодизеля. Известно, что многие микроорганизмы (водоросли, дрожжи, грибы) способны к активному синтезу и накоплению достаточно большого количества липидов, которые в свою очередь могут быть использованы в качестве основы для получения биодизеля. По сравнению с растительными маслами, микробные липиды имеют ряд преимуществ: высокая скорость роста, независимость от сезонных и климатических условий, независимость от посевных площадей.

Учитывая все вышесказанное, можно предположить, что в будущем получение биодизеля из микробной биомассы может стать одним из возможных путей получения данного вида топлива.

Цель данной работы – продолжение исследования возможностей создания основ для биотехнологического получения липидов мицелиального гриба *Cunninghamella japonica* с целью их дальнейшего использования в качестве исходного сырья для получения биодизеля. Ранее [Сергеева Я.Э. и др., 2008] нами было показано, что мукоровый гриб *Cunninghamella japonica* является суперолеагенным продуцентом липидов. Такие характеристики биодизеля, полученного на основе грибных липидов, как йодное число и теплоемкость соответствуют аналогичным показателям наиболее широко используемого в Европе биодизеля, полученного на основе рапсового масла.

В общем случае, биодизель получают путем переэтерификации предварительно выделенных липидов со спиртом в присутствии катализатора (кислоты или щелочи). Проведено сравнительное изучение методов выделения липидов с использованием различных растворителей. Полученные результаты показали, что использование двухэтапной экстракции с использованием этилового спирта и гексана позволило увеличить выход липидов по сравнению с традиционно используемым методом, выбранного в качестве стандарта, почти на 30%.

Возможен и другой способ получения биодизеля из биомассы олеагенных грибов – прямое метилирование биомассы (в присутствии кислоты) *in situ*, минуя этап выделения липидов. Проведена оптимизация ряда параметров данного процесса таких как: тип и концентрация катализатора, время и температура протекания реакции, а также подбор оптимального количественного соотношения реагентов биомасса гриба-спирт.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность использования биомассы мукорового гриба *Cunninghamella japonica* в качестве исходного сырья для

получения биодизеля, отвечающего требованиям международных стандартов. В условиях лаборатории при оптимальных условиях с использованием мукового гриба *Cunninghamella japonica* с 1 литра питательной среды можно получить до 6 г биодизеля.

ОСОБЕННОСТИ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОГО ЛОНГОЛИТИНОМ, ПРЕПАРАТОМ ИЗ ГРИБА *ARTHROBOTRYS LONGA* ПРИ ЕГО НАРУЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Серебрякова Т.Н., Подорольская Л.В., Шаркова Т.С., Тарантул В.З., Хромов И.С.

МГУ имени М.В.Ломоносова

Институт молекулярной генетики РАН

Москва

Препарат лонголитин, выделенный из культуральной жидкости низшего гриба *Arthrobotrys longa*, является реальным претендентом для создания эффективного лекарственного средства лечения венозных тромбозов. В данной работе обобщены результаты изучения лизиса тромбов лонголитином при экспериментальном тромбозе поверхностных вен: яремной вены крыс и краевой вены уха кролика при наружном нанесении препарата.

Наиболее важной характеристикой тромболизиса лонголитином является его местное локальное действие, ограниченное только тромбированной областью. У 25 крыс с тромбозом в яремной вене кровь, взятая до применения препарата и после растворения тромба, не отличалась существенно по большинству изучаемых параметров. Это означало, что препарат, проникая через покровные и мышечные слои в системный кровоток, не гидролизует, будучи комплексом протеаз, белки и ферменты систем гемостаза и фибринолиза, а осуществляет протеолиз только структур тромба и в первую очередь его основы-фибриновой сети.

Высокая специфичность лонголитина к компонентам тромба, необходимым этапом которой является адсорбция препарата на фибрине, обусловила и другую особенность тромболизиса лонголитином – большую скорость лизиса больших тромбов по сравнению с малыми. Действительно при тромбозе краевой вены уха кролика крупные тромбы размером 20-40 мм² растворялись со скоростью 0,04-0,12 мм²/мин., в то время как скорость лизиса небольших тромбов 3-10 мм² была 0,02-0,04 мм²/мин. Большие тромбы, вероятно, улавливают более значительные количества лонголитина в фибриновую сеть, куда привязываются и большие количества плазминогена - субстрата активаторной активности лонголитина, в результате образуются более высокие концентрации плазмينا, растворяющего тромб с более высокой скоростью.

В медицинской практике хорошо известна зависимость эффективности тромболитических средств от давности тромбоза: свежие тромбы лизируют существенно быстрее, чем старые с плотно упакованным стабилизированным фибрином. Лонголитин также проявил это свойство. Так при тромбозе на вене уха кролика из 26 тромбов, растворившихся в течение 2-х дней, скорость лизиса в первые 7 часов была 0,04-0,12 мм²/мин. а на другой день она составляла 0,01-0,03 мм²/мин. Значит лонголитин, как и другие тромболитические средства, следует применять как можно раньше.

Отличительной чертой тромболизиса лонголитином является отсутствие зависимости эффекта от применяемой дозы в пределах значительных колебаний концентраций (по весу сухого остатка от 3% до 0,3%). В 25 случаях применения 3% раствора препарата, 10 случаях использования 1% раствора и 15 случаях – 0,3% - скорость лизиса тромбов в краевой вене уха кролика была примерно одинаковой – 0,08-0,10 мм²/мин. Среди многих причин такого феномена одной из главных, скорее всего, является многокомпонентность состава лонголитина, присутствие в нем, кроме протеаз, возможно, и ингибиторов фибринолиза, частично связывающих активные ферменты и диссоциирующие при разбавлении, усиливая таким образом суммарный тромболитический эффект.

Тромболитическая активность лонголитина была различной у разных особей в зависимости от индивидуальных особенностей организма – она варьировала в

значительных пределах: от 0,01 до 0.60 мм² /мин. Но и у одного и того же животного она могла различаться, так она была больше в вене правого уха, чем левого.

Выявленные особенности тромболитического эффекта лонголитина – локальность действия, четкий эффект на больших тромбах, в малых дозах и в первые часы тромбообразования позволяет отнести лонголитин к перспективным тромболитическим средствам

ТРАМЕЛАН: ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Скворцова М.М.¹, Горшина Е.С.²

¹ – ЗАО «Микротэн»

² – Московский государственный университет инженерной экологии
Москва

Трамелан представляет собой препарат, активной субстанцией которого является сухая биомасса лекарственного базидиального гриба траметеса опушенного (*Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát) с добавлением органического цинка. Субстанция производится путем глубинного культивирования штамма-продуцента в жидких средах. Препарат выпускается в таблетированной форме по 0,5 г. Защищен патентом РФ.

Биологическая активность препарата обусловлена его составом, включающим нерастворимый гликано-хитиновый комплекс (около 30%) и растворимые 1,3-β глюканы (2-3%), относящиеся к группе иммуномодулирующих полисахаридов. Наличие в составе Трамелана таких соединений, как аминокислоты, низкомолекулярные пептиды, эссенциальные фосфолипиды, эргостерин, ненасыщенные жирные кислоты, убихиноны, витамины, олигосахариды, микроэлементы и пищевые волокна обуславливает его пребиотический эффект.

Клинические исследования Трамелана проводили в различных медицинских учреждениях на группах больных, состоящих из 20-40 пациентов, в сравнении с контрольными (принимавших стандартное лечение и плацебо) и фоновыми (состоящих из здоровых людей). группами, аналогичными по половому и возрастному составу.

Клинические исследования *иммуномодулирующих свойств* Трамелана показали достоверное увеличение активности и интенсивности фагоцитоза, бактерицидности плазмы и содержания лизоцима в сыворотке крови, а также его нормализующее действие на клеточный иммунитет. В частности показано, что Трамелан при использовании в комплексной терапии алкоголизма обладает выраженными иммунокорректирующими свойствами, что проявляется восстановлением до нормы клеточных и гуморальных факторов иммунной системы. Включение в курс терапии препарата «Трамелан» способствует положительной динамике, вплоть до нормализации, таких составляющих иммунной системы, как содержание в крови CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов (интерлейкинов ИЛ-1-бета, ИЛ-2 и ИЛ-4).

Изучение показателей свободнорадикального окисления в крови пациентов показало снижение практически до нормы свободнорадикальных процессов как в плазме, так и в форменных элементах крови (эритроцитах и лейкоцитах), что подтверждает *антиоксидантные свойства* Трамелана.

Показано, что прием Трамелана *способствует восстановлению детоксицирующей функции печени* и нормализации биохимических показателей при воспалительных процессах в гепатобилиарной системе. Положительный лечебный эффект и восстановление до физиологической нормы оксидаз-смешанной функции печени проявлялся у всех больных. После окончания комплексного лечения была зарегистрирована положительная динамика показателей белкового и липидного обмена.

Применение Трамелана пациентами с ослабленным интерфероновым статусом (пациенты, часто болеющие ОРВИ) уже через 2 недели приводило к значительному повышению синтеза иммунными клетками интерферонов - α, β и γ, отвечающих за неспецифическую защиту организма от вирусной инфекции. Показатели синтеза сывороточных интерферонов приходили в норму. Полученные результаты позволяют отнести Трамелан к группе *интерфероногенных препаратов*.

Были показаны также *антидепрессантные свойства* Трамелана: у больных наблюдалось достоверное снижение уровней невротизации, тревоги и депрессии.

Все выявленные в процессе исследований свойства Трамелана позволяет признать его перспективным средством для использования в комплексной терапии гепатитов инфекционной, алкогольной и неалкогольной этиологии.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГРИБОВ АКАПОЧВ ШЕЛЬФА ОСТРОВА САХАЛИН

Слинкина Н. Н., Пивкин М. В., Сметанина О. Ф., Бурцева Ю. В., Юрченко А.Н.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН

Владивосток

Аквапочвы составляют самостоятельную природную гидрочувствительную область шельфовой зоны морей и подводного материкового склона океанов. Они возникли в результате самого древнего педосферного процесса на нашей планете (Ивлев, Нестерова 2004). К грибам аквапочв в настоящее время относят грибы, составляющие комплексы грибов почв в местообитаниях покрытых морской водой.

Всего было изучено 48 образцов аквапочв различного гранулометрического состава (илистый песок, галька с примесью мелкозема и песок), из которых выделено около 2000 изолятов мицелиальных грибов. Видовое разнообразие грибов шельфовой зоны острова Сахалин представлено 131 видом из 45 родов, где подавляющая часть – представители группы анаморфных грибов (90%) и только 10% относится к *Ascomycota*.

Грибные комплексы аквапочв представлены в основном видами из родов *Penicillium* (33 вида), *Aspergillus* (16), *Acremonium* (13), *Cladosporium* (6), *Scopulariopsis* (4). Десять видов микромицетов были впервые обнаружены в морской среде: *Pseudeurotium ovale*, *Acremonium berkeleyanum*, *A. recifei*, *Malbranchea* sp., *Penicillium resedanum* McLennan et Ducker, *Nattrassia mangiferae* (Syd. et P. Syd.) B. Sutton et Dyko, *Myceliophthora fergusii* (Klopotek) Oorschot, *M. lutea* Costantin, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*.

Нами была изучена продукция О-гликозилгидролаз грибами аквапочв. Выявлены ранее неизвестные продуценты как отдельных О-гликозилгидролаз, так и широкого набора ферментов. Детально исследованы каталитические свойства 1.3-β-D-глюканаза и N-ацетилгексозаминидазы, выделенных из *Penicillium canescens*. Показана возможность использования исследованных ферментов для биотехнологических целей и установления структуры углеводов.

Для поиска перспективных источников биологически активных соединений нами были выделены 105 штаммов грибов. Этилацетатные экстракты выделенных грибов были исследованы на содержание в них антибиотических соединений по отношению к грамположительным (*Bacillus subtilis* (КММ 430), *Staphylococcus aureus* (ATCC 21027)), грамотрицательным (*Pseudomonas aeruginosa* (КММ 433), *Escherichia coli* (ATCC 15034)) бактериям и дрожжевым грибам (*Candida albicans* (КММ 455)). В результате были выявлены 7 штаммов активных по отношению к *C. albicans*, 17 – *S. aureus*, 34 – *E. coli*, 32 – *B. subtilis*, 20 – *P. aeruginosa*. Из экстрактов грибов аквапочв были выделены и охарактеризованы 13 метаболитов, среди которых выявлены 5 биологически активных веществ новой структуры. Среди выделенных метаболитов выявлены 4 токсина, 3 соединения оказались перспективными контрацептивами и 6 веществ показали антибиотические свойства.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00289-а и грантом ДВО РАН.

ГРИБЫ - ПРОДУЦЕНТЫ ИНУЛИНАЗЫ КАК ОБЪЕКТЫ НОВЕЙШИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Стойко В.И., Айзенберг В.Л., Жданова Н.Н., Курченко И.Н., Капичон А.П., Бурбан А.Ф., Коновалова В.В.

*Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины
Национальный университет «Киево-Могилянская Академия»
Киев, Украина*

Инулиназа (2,1-β-D-фруктозан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) катализирует ферментативный гидролиз инулина – полимера β-1,2-связанной фруктозы. Деградация инулина происходит путем последовательного отщепления фруктозных остатков. Сфера применения микробной инулиназы многообразна. Она может найти применение при получении сахаристых веществ, этанола, молочной кислоты путем гидролиза нетрадиционного сельскохозяйственного сырья.

Биосинтез инулиназ установлен у микроорганизмов различных таксономических групп. Изучение инулиназ проводилось у бактерий, микроскопических грибов, у разных видов дрожжей. Микромицеты синтезируют внеклеточную инулиназу, в то время как бактерии *Bacterium licheniformis* и дрожжи рода *Kluyveromyces* – внутриклеточную. При проведении биотехнологических процессов внеклеточные инулиназы микроорганизмов предпочтительнее внутриклеточных.

Расширение сфер использования микромицетов для практических целей основывается на изучении их физиологических и биохимических особенностей.

В результате проведенного скрининга по способности к образованию инулиназы среди коллекционных культур микромицетов селекционированы два новых штамма грибов-продуцентов инулиназы: *Penicillium sp. 225* и *Aspergillus sp.8TX*. Полученные данные по изучению влияния источников углерода, азота и фосфора на биосинтез фермента отобранными штаммами микромицетов дали возможность подобрать состав питательной среды и разработать условия их культивирования. В настоящей работе представлены результаты оптимизации питательной среды для выращивания грибов-продуцентов фермента, определено оптимальное содержание индуктора в среде. Исследовано влияние температуры выращивания селекционированных микромицетов на рост грибов и величину инулиназной активности. При изучении активности инулиназы в динамике роста культуры установлено, что использование посевного материала в виде инокулюма сокращает сроки культивирования продуцента с шести суток до трех. Показано, что при хранении культуры на протяжении двух лет сохраняется до 70% активности фермента.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ

Супрун С.М., Курченко И.Н., Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАНУ

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К.Заболотного НАНУ

Киев, Украина

Микромицеты широко используются сегодня для промышленного производства ферментов, антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. В этой области микробиологические технологии представляют реальную альтернативу химическому синтезу. С участием микромицетов разработаны новые биотехнологии получения липидов, пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса, β -каротина (*Blakeslea trispora*).

Целью данной работы был поиск среди коллекционных штаммов микромицетов перспективных продуцентов витаминов и коферментов, подбор условий для повышения выхода биологически активных соединений.

После предварительной селекции нами было отобрано несколько штаммов микромицетов – перспективных продуцентов биологически активных соединений, в частности, витаминов и коферментов. Так штамм *Fusarium sambucinum* оказался способным синтезировать и накапливать повышенные количества никотиновой кислоты и ее производных, коэнзима А (CoA), убихинона Q₁₀; штамм *Mycelia sterilia* (white) – тиамин и его производных, *Penicillium sclerotiorum* – продуцент β -каротина, *Penicillium vitale* – продуцент флавинадениндинуклеотида (ФАД), который входит в состав фермента глюкозооксидазы.

Изучено действие предшественников биосинтеза витаминов и коферментов на их конечный выход. Показано, что введение триптофана в культуральную среду повышает выход никотиновой кислоты, а введение самой никотиновой кислоты – выход ее коферментной формы – никотинадениндинуклеотида (NAD). Изучены условия биосинтеза CoA и ФАД штаммами-продуцентами. При добавлении в реакционную смесь предшественников синтеза CoA и ФАД их выход значительно повышался. Отмечено, что в условиях индукции никотиновой кислотой синтез NAD наблюдалась интенсификация роста мицелия, а также раннее образование в культуре конидий. На бесклеточном экстракте *Fusarium sambucinum*, растущего в среде с ниацином и триптофаном, показано снижение в этих условиях активности пиррофосфорилазы. Изучение активности ключевых ферментов биосинтеза NAD–триптофанпиролазы и NAD- пиррофосфорилазы позволило установить существование двух путей биосинтеза NAD в клетке гриба-продуцента. Внесение в среду аденозина – одного из предшественников синтеза NAD приводило к активации NAD–пиррофосфорилазы, что стимулировало запасной путь сверхсинтеза кофермента NAD у *Fusarium sambucinum*.

Результаты проведенного исследования создают 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.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

Сухомлин М.Н., Бисько Н.А., Кутковая О.В.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного

Киев, Украина

Последние годы много внимания уделяется грибам-продуцентам биологически активных веществ (витамины, антибиотики, ферменты, аминокислоты, терпены, полисахариды, фитотоксины). Благодаря своим биологическим, физико-химическим и фармакологическим свойствам различные виды грибов нашли применение в таких областях промышленности, как пищевая, деревообрабатывающая, фармакологическая, в косметологии, медицине и сельском хозяйстве. Особый интерес вызывают вопросы, связанные с изучением лекарственных свойств базидиальных макромицетов. Многие грибы проявляют различное фармакологическое действие - от общеукрепляющего и антиракового до противотуберкулезного и психотропного, а также стимулируют пищеварение, работу мозга, лечат экзему, подагру, рак молочных желез, хронические нефриты, нейродерматиты, неврастению и прочее.

При изучении противобактериальной активности некоторых базидиомицетов (*Coriolus versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Coprinus comatus*, *Marasmius oreades*, *Stereum hirsutum*, *Collybia maculata*, *Flammulina velutipes*, *Oudemansiella mucida*, *Sparassis crispa*, *Laccaria amethystine*, *Lyophyllum connatum*) использовали мицелий и культуральный фильтрат грибов. Антибактериальную активность исследовали методом дисков на следующих патогенных микроорганизмах: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* sp. Антимикробную активность устанавливали по наличию зон задержки роста тест-организма.

По отношению к *Streptococcus* sp. противобактериальную активность проявили мицелиальные экстракты *Schizophyllum commune* и *Oudemansiella mucida*: зона ингибирования составила 7 мм и 6,5 мм, соответственно. Вытяжки из мицелия *Lyophyllum connatum* и *Sparassis crispa* проявили незначительную активность по отношению к *Escherichia coli* (диаметр зоны угнетения составил 6,5 и 7 мм, соответственно). Активность по отношению к *Staphylococcus* sp. установлена лишь у одного вида - *Flammulina velutipes* (диаметр зоны лизиса составил 7 мм). У других базидиомицетов противобактериальные свойства мицелия не выявлены.

При исследовании антимикробных свойств культурального фильтрата данных видов базидиальных грибов установлено, что по отношению к *Streptococcus* sp. активность проявляет культуральный фильтрат *Schizophyllum commune* (диаметр зоны лизиса составил 9 мм). Данный вид обладал антагонистической активностью по отношению к *Streptococcus* sp. и в виде мицелиального экстракта. Культуральная жидкость *Flammulina velutipes* и *Laccaria amethystine* также проявили активность по отношению к указанному микроорганизму (диаметр зоны угнетения составил 7 и 8 мм, соответственно), хотя их мицелиальные экстракты не проявили активность. По отношению к *Escherichia coli* действенными оказались культуральные фильтраты *Lyophyllum connatum*, *Flammulina velutipes*, *Oudemansiella mucida* и *Collybia maculata*. По отношению к *Staphylococcus* sp. противобактериальная активность установлена у культуральных фильтратов грибов *Schizophyllum commune* и *Oudemansiella mucida*.

Таким образом, среди исследуемых видов базидиомицетов выявлены виды, проявляющие антагонистическое влияние на *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. и *Escherichia coli*. Причем некоторые виды проявляли антимикробные свойства как в виде мицелиального экстракта, так и при использовании культурального фильтрата. Антагонистическое действие по отношению к *Klebsiella* sp. не установлены ни у одного вида.

Исследования проводились при финансовой поддержке гранта № 25.5/066 ГФФИ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДА СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА БАРДЫ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ БИОСИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Тихонова О.В.

ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН

Москва

Известно, что в биотехнологических процессах при культивировании штаммов-продуцентов биологически активных веществ в качестве компонентов питательных сред традиционно используют дорогостоящие продукты, например, муку, сахара, растительные и животные белки, соли, очищенную воду. С другой стороны известно, что при производстве спирта остается большое количество отхода – барды, содержащей остаточные питательные вещества, а также продукты жизнедеятельности пекарных дрожжей. Известно, что при производстве 1 л этилового спирта образуется 10-12 л барды, причем в России ежегодно ее суммарный объем составляет более 10 миллионов тонн (Пищевая промышленность, 2004, № 3, сс. 293-294).

Утилизация жидкой составляющей барды представляет большую сложность и в настоящее время заключается либо в упаривании с последующим использованием в кормопроизводстве, что требует больших затрат электроэнергии, либо выбрасывается во внешнюю среду, что приводит к загрязнению природы из-за возникновения не утилизируемой гелеобразной пленки, препятствующей росту растений, или нарушению биоценозов водоемов.

На основании проведенных исследований разработан способ экономичного получения антибиотиков и других биологически активных веществ методом глубинного культивирования, основанным на использовании питательных сред, содержащих барду или ее фильтрат в качестве единственного источника питательных веществ или основного компонента питательных сред.

Данный способ может быть применен для получения, например, антибиотиков иллуцинов М и S, лагоподина В, бензил- и феноксиметилпенициллинов, БАД к пище, например, БАД к пище «ОВО-Д», ферментов, например, ферментных комплексов шляпочного гриба *Pleurotus ostreatus*. Разработанные среды позволяют получать уровни биосинтеза перечисленных соединений, равные или превышающие уровни, ранее разработанные для продуцентов указанных веществ на промышленных средах (патенты РФ 2035514, 2192873).

Таким образом, разработанные культуральные среды позволяют экономить дорогостоящие компоненты питательных сред, а также очищенную (водопроводную) воду. Кроме того, предложенный способ одновременно решает ряд экологических проблем, связанных с утилизацией отхода спиртового производства барды.

АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *Lentinus edodes*: ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ, ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ.

Тренин А.С., Соболева Н.Ю., Автономова А.В., Цвигун Е.А., Федорова Г.Б., Катруха Г.С., Исакова Е.Б., Бухман В.М., Краснопольская Л.М.

ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН

Москва

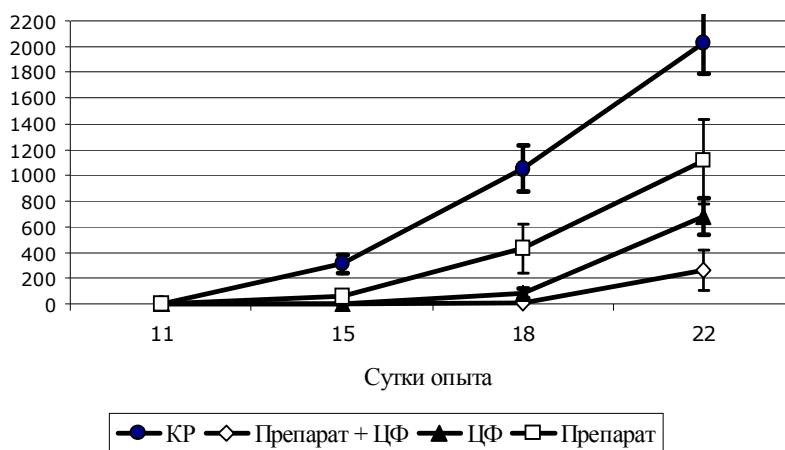
Предложена система скрининга, включающая в себя комплексное изучение разнообразных свойств микробных продуцентов, позволяющая отбирать штаммы базидиомицетов, способных к продукции сразу нескольких биологически активных веществ, характерных для всего вида в целом.

Выявлен штамм *L. edodes*, обладающий одновременно антимикробными свойствами, а также выраженной гиполипидемической и противоопухолевой активностью. Противоопухолевая активность штамма связана с образованием продуктов первичного метаболизма – водорастворимых полисахаридов. Антимикробная и гиполипидемическая активность штамма *L. edodes* являются результатом продукции вторичных метаболитов.

Противоопухолевое действие полисахаридов выражалось в их способности к торможению роста опухоли Т-лимфомы EL-4 и лимфолейкоза Р 388, а также в выраженном потенцировании действия противоопухолевого препарата - циклофосфида (ЦФ) у мышей

при

Рассчетная масса
опухоли, мг



пероральном введении.

В экспериментах с использованием бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *H. halobium*) обнаружена гиполипидемическая активность антибиотического комплекса *L. edodes* – его способность к подавлению биосинтеза стеролов.

Проверка образуемых штаммом индивидуальных компонентов А и В, полученных методом препаративной ТСХ из экстрактов культуральной жидкости и идентифицированных нами как лентинамицин В и лентинацин (эритаденин), показала практически полное отсутствие у этих антибиотиков способности к подавлению биосинтеза стеролов. Таким образом, выявленная нами у штамма *L. edodes* гиполипидемическая активность, по-видимому, не связана с образованием этой культурой антибиотиков лентинамицина В и лентинацина (эритаденина).

СТРОЕНИЕ ФУКОГАЛАКТАНА ИЗ МИЦЕЛИЯ *GANODERMA LUCIDUM*

Усов А.И.¹, Евсенко М.С.^{1,2}, Шашков А.С.¹, Автономова А.В.²,

Краснопольская Л.М.²

1 – Институт органической химии имени Н.Д.Зелинского РАН, Москва

2 – НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН

Москва

Из мицелия гриба *G. lucidum*, выращенного методом погруженного культивирования, экстракцией горячей водой получена фракция полисахаридов, обладающая выраженной противоопухолевой активностью. С помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в СГ-форме эту фракцию разделили на нейтральные и кислые компоненты. Последующая хроматография нейтральных компонентов на той же колонке в боратной форме позволила выделить полисахарид, $[\alpha]_D^{15} +37.9$ (с 1, вода), построенный из остатков галактозы и фукозы в соотношении 4:1. Удобным препаративным методом выделения этого полисахарида оказалось осаждение цетавлоном его боратного комплекса. Строение фукогалактана было установлено с помощью спектроскопии ЯМР в сочетании с методом метилирования. Показано, что основу полисахаридных молекул образуют линейные цепи из (1→6)-связанных остатков α -D-галактопиранозы, причем каждый четвертый остаток главной цепи в положении 2 несет боковое ответвление в виде остатка α -L-фукопиранозы.

Близкие по структуре фукогалактаны были выделены ранее из нескольких видов высших грибов, в том числе из плодовых тел *G. lucidum*. Известно, что они обладают разнообразной биологической активностью, в частности, сильно тормозят развитие таких опухолей как саркома 180 и солидная карцинома Эрлиха. Полученный нами препарат фукогалактана передан на биологические испытания.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Филимонова Т.И., Борисенко О.А.

*ГУ ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности
Москва*

В процессе сбраживания пивного сусла создаются условия, которые неблагоприятно воздействуют на жизнедеятельность дрожжей. Основные виды угнетающих факторов для дрожжевых клеток: осмотический, этанольный и температурный стрессы.

При культивировании дрожжей сусло должно иметь начальную плотность 10-13,5%. С увеличением концентрации сахара угнетается размножение дрожжей: ингибирующей считают массовую долю сахара более 15%.

Спирт образуется в процессе брожения, его влияние на дрожжи определяют как этанольный стресс. Спирт угнетает как скорость размножения дрожжей, так и процесс брожения. Не ингибирующей является концентрация этанола менее 1,2%. Содержание спирта 19,5% полностью тормозит ферментацию, при этом играет роль не только концентрация этанола, но и время воздействия на дрожжи..

В последнее время как в нашей стране, так и за рубежом, наблюдается тенденция к увеличению выпуска и реализации крепкого пива. Кроме того, большой интерес вызывает высокоплотное пивоварение, когда после сбраживания концентрированного сусла перед реализацией его разводят водой до нужной плотности. Высокоплотное пивоварение дает возможность на существующем оборудовании произвести большее количество пива без инвестиционных затрат.

Промышленные дрожжи в случае плотного пивоварения подвергаются воздействию высоких концентраций этанола. При экстрактивности начального сусла 23% объемная доля спирта составляет не менее 9,4%.

Одна из главных проблем высокоплотного пивоварения – необходимость заставить дрожжи работать при высоком содержании сахара в сусле и высокой концентрации алкоголя, образующегося в процессе брожения. Для решения этой проблемы используют некоторые технологические приемы: добиваются большего содержания в сусле ассимилируемого азота и растворенного кислорода. Можно получить приемлемые результаты, увеличивая норму введения дрожжей. Однако, это имеет следствием старение популяции дрожжевых клеток и возникает необходимость замены на новую дрожжевую разводку, так как старые клетки имеют пониженную жизнеспособность и в большей мере подвержены стрессам.

Поведение дрожжей в отношении устойчивости к этанолу изучалось с генетической точки зрения. Исследования гаплоидных сегрегантных штаммов, полученных из диплоидов, и различных комбинаций скрещивания между высоко- и низкотолерантными штаммами показали, что устойчивость к этанолу контролируется генной системой и обусловлена большим количеством генов, которые влияют на размножение дрожжей в присутствии спирта. Однако, они действуют таким образом только в изогенном состоянии, поэтому гибридные культуры более толерантны к алкоголю. В добавление к полигенной системе, ответственной за устойчивость к этанолу, возможно влияние геномодификаторов. Гены, лимитирующие рост, различны при различных концентрациях этанола, так как кинетика подавления этанолом является результатом подавления различных функций клетки. Отмечалось, что устойчивые к алкоголю культуры отличаются повышенной скоростью брожения.

В нашем исследовании ставилась задача подобрать из коллекции пивных дрожжей такие расы, скорость размножения и жизнеспособность которых в меньшей степени угнетаются повышенными концентрациями этанола и высоким осмотическим давлением плотного сусла. Для проведения исследования отобрали 14 рас дрожжей, о которых было известно, что они быстро и глубоко сбраживают пивное сусло.

При изучении влияния на дрожжевые клетки высоких концентраций спирта подсчитывали начальное содержание дрожжей и количество дрожжей после инкубации в сусле с экстрактивностью 11% и содержанием этилового спирта 9 и 12% по объему.

Для определения процента не жизнеспособных дрожжевых клеток к препарату анализируемой дрожжевой разводки добавляли каплю метиленового синего. Нежизнеспособные клетки окрашиваются в синий цвет вследствие того, что клеточная мембрана и оболочка мертвых клеток не препятствует проникновению краски.

В среде с содержанием 9% спирта продолжалось размножение исследованных рас дрожжей, полностью такая концентрация этанола подавляла размножение только двух рас: 129 и 176. Наибольшую устойчивость к высоким концентрациям спирта проявили расы: 11, 145, 149 и Rh. Под действием 9% этанола коэффициент размножения этих рас снизился только в 8-12 раз, в то время как у остальных исследованных нами дрожжей размножение подавлялось в 16-70 раз. Расы, устойчивые к воздействию 9%-ного спирта, сохраняли способность к некоторому увеличению биомассы даже при 12% этанола. Спирт не только тормозит размножение дрожжей, но и является причиной гибели дрожжевых клеток. Под действием 9-12%-ного спирта большое количество мертвых клеток отмечено у рас: 129, 34/70, 308 и 176. Очень устойчивы к воздействию этанола дрожжи расы 11: количество мертвых клеток в культуре не увеличивалось в присутствии 9-12% спирта. Сохраняли в значительной мере свою жизнеспособность расы 145, 149 и Rh. Наблюдается заметная корреляция между снижением способности к размножению и гибелью клеток под действием спирта.

По технологиям, принятым в нашей стране, в соответствии с ГОСТ Р 51174-98 допускается экстрактивность начального суслу 23%. На сусле такой плотности определяли коэффициент размножения, контролем служили данные, полученные на 11%-ном сусле. Плотное сусло почти во всех случаях в 1,1-1,6 раза снижало способность дрожжей к размножению. Наиболее чувствительными к плотному суслу оказались дрожжи расы 34/70, у которых коэффициент размножения снизился в 9 раз.

Если размножение дрожжевых клеток тормозилось при высокой плотности суслу, то на увеличение количества мертвых клеток плотность суслу не оказывала значительного влияния.

Таким образом, по совокупности данных, полученных при воздействии осмотического и этанольного стресса на 14 рас пивных дрожжей, можно прийти к выводу, что высокие концентрации этанола (9% и выше) угнетают размножение дрожжей в 8-70 раз, а количество мертвых клеток увеличивается в 1,2-2,8 раза. Высокая экстрактивность суслу (23%) в меньшей степени влияет на состояние пивных дрожжей: коэффициент размножения снижается в 1,1-1,6 раз, количество мертвых клеток увеличивается незначительно. Наиболее устойчивы к этим двум видам стресса следующие расы пивных дрожжей: 11, Rh, 149 и 145.

К ВОПРОСУ О БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПОТЕНЦИАЛЕ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ С ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Цивилева О.М., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Саратов

Новейшие публикации свидетельствуют о постоянно возрастающем значении лектинов для изучения углеводов-содержащих биополимеров. Имобилизованные лектины интенсивно используются в исследованиях в области гликопротеомики для детектирования и связывания гликопротеинов.

Поскольку многие именно N-связанные гликопротеины экспонированы на внешней поверхности клеточной мембраны или секретируются клетками, они достаточно доступны для биомедицинских экспериментов, в частности, для поиска маркеров патологических процессов при болезнях Альцгеймера и Паркинсона. При N-гликозилировании олигосахариды ковалентно связаны с остатками аспарагина через N-ацетилглюкозамин в особых участках белка Asn-Xxx-Ser(Thr). На создание экспрессных и чувствительных методик выявления N-связанных гликопротеинов направлены значительные усилия [3]. Сообщается о технологии ковалентного присоединения металл-хелатирующих полимеров к лектинам с целью применения лектинового конъюгата в масс-спектрометрии (ICP-MS) для выявления гликопротеинового профиля.

Для вышеперечисленных и иных современных исследований важен поиск лектинов с редкой или уникальной моносахаридной специфичностью. О специфически связывающем арабинозу (Ara) препарате лектина *грибного* происхождения сообщалось только в работе. Этот лектин выделен из дискомицета *Peziza sylvestris*. В нашей работе лектин, гемагглютинирующая активность которого ингибируется Ara, выделен из культуральной жидкости базидиомицета *Lentinus edodes*. Помимо углеводной специфичности к Ara, лектин (L2) необычен как внеклеточный, из базидиомицета. L2 -протеогликан с моносубъединичной структурой, молекулярной массой 37 кДа. Углеводная часть L2 представлена глюкозой (73% общей массы углеводной части молекулы лектина) и галактозой (27% общей массы углеводной части молекулы лектина). В L2 высоко содержание полярных аминокислот, прежде всего Asx - около 42% от суммы аминокислот. Элементный анализ (на содержание азота) показал, что Asx присутствует в виде Asn. Высокое содержание Asn в составе L2 согласуется с нашими данными о положительном эффекте Asn в отношении формирования коричневой мицелиальной пленки *L. edodes* в глубинной культуре. Кроме того, высокий уровень Asn в L2 наряду с составом углеводной части молекулы позволяют отнести этот лектин к N-аспарагинсвязанным. Белковая часть связывается с углеводной через Asn, который, вероятно, преобладает в составе потенциальных сайтов гликозилирования.

Обнаруживаются новые технологически важные природные гликопептиды, биологическая активность которых определяется не только гликановым пулом в целом, но и Ага-участками молекулы как функциональной областью. Важный инструмент их исследования - Ага-специфичные лектины.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА *ASPERGILLUS PARVULUS*

Цыганенко Е.С.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
Киев, Украина*

В настоящее время физиологические аспекты большинства известных видов микромицетов достаточно хорошо изучены, благодаря чему многие из них нашли промышленное применение в различных биотехнологиях. Классическим примером являются грибы рода *Aspergillus* – известные продуценты биологически активных веществ.

Нам представляется особенно интересным изучение физиологии грибов – потенциальных продуцентов, выделенных из экстремальных ниш обитания. Примером могут служить изучаемые в нашей лаборатории микромицеты, выделенные из зоны отчуждения ЧАЭС, в частности вид *Aspergillus parvulus*, представленный в нашей коллекции 20 штаммами. На сегодняшний день о биосинтетических свойствах этого вида информации в литературе крайне мало; известно лишь об выделении и описании нескольких метаболитов, данные о биологической активности которых отсутствуют.

Ранее нами было показано, что все штаммы *A. parvulus*, обладают широким спектром биологических активностей, а именно: антибиотической (широкого или узкого спектра действия), фитотоксической (высокой или низкой), а также гербицидной по отношению к семенам растений. Эти исследования показали нам необходимость дальнейшего изучения физиологии этого вида с возможной перспективой практического использования его метаболитов. Для дальнейшей работы был отобран штамм, обладающий антибиотической активностью широкого спектра действия и высокой фитотоксической активностью.

С целью углубления знаний о физиологии *A. parvulus* нами была проведена серия опытов, направленных на достижение условий, при которых выход биологически активного метаболита стремился бы к максимальному значению. Исследование значимых физических факторов показало, что наиболее оптимальными условиями для биосинтеза активного метаболита являются следующие: температура 26 °С, рН питательной среды 5, отсутствие света, глубинный способ культивирования.

Целью данной работы было исследования влияния значимых химических факторов, а именно: подбор и соотношение источников углерода и азота, влияние различных органических и минеральных добавок.

При изучении влияния состава питательной среды как источники углерода использовали моносахариды (глюкозу, рамнозу, маннит), дисахариды (сахарозу, лактозу) и трисахарид (рафинозу), а как источники азота – нитрат натрия, нитрат аммония, мочевины и пептон. В результате исследования было показано, что наибольшая биологическая активность культурального фильтрата наблюдалась в случае использования в качестве источников углеродного и азотного питания глюкозы и нитрата натрия, соответственно.

При изучении соотношения компонентов углеродного и азотного питания использовали среду Чапека стандартного состава (контроль) (глюкоза – 20 г/л, нитрат натрия – 2 г/л), а также среду А, которая характеризовалась недостатком обоих компонентов (глюкоза – 1 г/л, нитрат натрия – 0,1 г/л) и среду Б, характеризующуюся недостаточным содержанием источника азота (глюкоза – 25 г/л, нитрат натрия – 0,1 г/л). Грибы культивировали на качалке при 220 об./мин. в течение 7 суток, пробы отбирали каждые 24 часа. Было показано, что при культивировании на среде Чапека максимум биологической активности наблюдался на 7 сутки культивирования, в то время как на обеих средах с недостаточным питанием максимум биологической активности наблюдался уже на 5 сутки. Кроме того, было установлено, что биологическая активность культурального фильтрата при культивировании гриба на недостаточных средах большая, чем на контрольной среде.

В опытах по изучению влияния различных органических и минеральных добавок на синтез биологически активного метаболита *A. parvulus* грибы выращивали на средах А и Б, а также контрольной среде Чапека, содержащих такие вещества: гидролизат казеина (0,08 %), дрожжевой автолизат (0,25 %), кукурузный экстракт (0,45 %) и микроэлементы – молибден (0,05 мкг/л), кобальт (0,1 мкг/л), медь (0,4 мкг/л), цинк (8,8 мкг/л), марганец (0,15 мг/л), смесь всех микроэлементов. Грибы культивировали в течение 6 суток. Было показано, что на контрольной среде из всего набора исследуемых добавок значительно повышал синтез биологически активного вещества только гидролизат казеина, на среде А – цинк, марганец и смесь микроэлементов, на среде Б – гидролизат казеина, дрожжевой автолизат и аналогичный среде А набор микроэлементов. Интересным выявился факт полного ингибирования синтеза биологически активного метаболита на средах А и контрольной при добавлении дрожжевого автолизата и кукурузного экстракта. Таким образом, полученные данные показывают возможность дальнейшего исследования направленного синтеза биологически активного метаболита *A. parvulus*, проявляющего широкий спектр биологических активностей, с целью достижения его максимального выхода.

ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИТОСПОРОВОГО ГРИБА-ПРОДУЦЕНТА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА-АКТИВАТОРА.

Шаркова Т.С., Серебрякова Т.Н., Подорольская Л.В., Хромов И.С., Тарантул В.З.

МГУ имени М.В.Ломоносова

Институт Молекулярной генетики РАН

Москва

Клинические препараты-тромболитики с активностью активатора плазминогена – специфические средства лечения сердечно-сосудистых заболеваний – в настоящее время представлены в основном стрептокиназой из гемолитического стрептококка, тканевым активатором, урокиназой и их аналогами, полученными методами генной инженерии. К сожалению, из-за ряда свойств (аллергенности, недостаточной устойчивости к ингибиторам, короткому периоду жизни в кровотоке и т.д.) и чрезвычайно высокой стоимости они не могут быть использованы в востребованном масштабе. Поэтому поиски новых источников тромболитических препаратов-активаторов, пригодных для клиники и доступных по цене практической медицине, по-прежнему являются актуальной проблемой. Возможным перспективным направлением этих поисков нам представляется развитие отечественной биотехнологии производства тромболитиков с использованием грибов-продуцентов.

Лонголитин - комплекс тромболитических, фибринолитических и активаторных ферментов митоспорового гриба *Arthrotrrys longa*. Гелевая лекарственная форма препарата (ГЛФ) нетоксична, не вызывает аллергии и эффективно лизирует наружные тромбы у животных в модельных экспериментах. Лонголитин может найти применение в клинике при лечении тромбозов и флеботромбозов, а способ его получения предполагает возможность организации рентабельного производства.

Биосинтез целевого продукта - лонголитина (комплекса экзоферментов) - происходит в глубинной культуре *A. longa* на простой 4-х компонентной синтетической среде, оптимизированной при использовании методов математического планирования экспериментов. Активное начало выделяется из осветленной культуральной жидкости. Получение культурального фильтрата (КФ), свободного от мицелия и конидий, в лабораторных условиях достигается центрифугированием (10.000 об/мин). При масштабах производства с объемами более 20 л КФ предполагается использование высокопроизводительных фильтровальных установок с повышенной турбулентностью потока. Осаждение экзоферментного комплекса проводится 2-кратным объемом охлажденного до -20 С ацетона (этанола). Отфильтрованный осадок подвергают мягкой

сушке над концентрированной серной кислотой при температуре +4 С. Высушенный «первичный» препарат лонголитина в концентрации 0,1 % используется для приготовления ГЛФ, содержащей 5-10 ед. гепарина. Ферментная составляющая ГЛФ остается активной не менее двух лет. По нашим данным, в течение двадцати лет количество активатора в препарате лонголитина, при использовании соответствующих методов селекции гриба–продуцента, практически остается неизменным и составляет около 50% от его общей фибринолитической активности.

Таким образом, основные этапы получения препарата лонголитина могут соответствовать требованиям, которые предъявляются экономически выгодным биотехнологическим разработкам.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ СЪЕДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ГРИБА ОПЕНКА ЗИМНЕГО *FLAMMULINA VELUTIPES* (FR.) P. KARST В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Шелюк А. И.

Институт ботаники имени М. Г. Холодного НАН Украины

Институт гигиены и медицинской экологии имени О. М. Марзеева АМН Украины

Киев, Украина

Целью работы было изучение штаммовой вариабельности *Flammulina velutipes* за количественным содержанием макро-, микроэлементов в плодовых телах при культивировании в закрытой экосистеме.

Всего для исследований было взято 7 штаммов *F. velutipes*. Три штамма отобраны в чистую культуру с карпофоров растущих на древесине в центре города Донецка. Другие 4 штамма отобраны нами с карпофоров произрастающих на древесине донецкого ботанического сада. Субстратом для культивирования служили опилки ясеня с пшеничными отрубями (3:1).

Наивысшие значения золы были обнаружены в плодовых телах штаммов изолированных в чистую культуру в центре города Донецка: 16,8 %, 14,5 %, 13,7 % ($p < 0,05$) а наименьшие значения на территории Донецкого ботанического сада: 6,2 – 6,8 % ($p > 0,05$).

Для штаммов изолированных в культуру на территории ботанического сада вторым макроэлементом после натрия был магний в то время как для другой группы штаммов сера. Такие внутри видовые отличия *F. velutipes* могут быть связаны с определенными физиологическими особенностями штаммов, которые были сформированы на протяжении длительного времени при особенных биоэкологических условиях местности.

Суммарное содержание микроэлементов в плодовых телах штаммов выделенных в чистую культуру с центра города Донецка в 2,1 – 2,5 раза выше, чем с ботанического сада. При этом фиксировали превышение ПДК (предельно допустимая концентрация) за нормативными документами (НД) для штаммов первой группы за содержанием свинца в 1,2 – 1,4 раза, цинка в 2,3 – 3 раза и меди в 1,2 раза. В тоже время превышения ПДК кадмия фиксировали для обеих групп. Так для штаммов изолированных в культуру с ботанического сада в 2 раза, а с центра Донецка в 5 раз. Отличительной особенностью последних было обнаружение в плодовых телах свинца на уровне в количествах 0,24 мг/кг, 0,6 мг/кг и 0,7 мг/кг, что превышает установленные ПДК для грибных продуктов в последних двух штаммах в 1,2 и 1,4 раза.

Таким образом, за результатами проведенных исследований четко прослеживается внутривидовая вариабельность вида *F. velutipes* по способности до накопления тяжелых металлов плодовыми телами. Одной с причин такого явления может быть адаптация данного вида до разных биоэкологических условий местности, которые характеризуются разной степенью антропогенной нагрузки. Так за нашими наблюдениями и данными литературы центр Донецка более антропогенно нагружен передвижными и стационарными источниками загрязнения, чем территория ботанического сада.

Из литературных данных известно, что одним из источников загрязнения плодовых тел токсическими поллютантами является питательная среда. А так, как данный субстрат может быть использован при искусственном культивировании *F. velutipes*, следует обязательно проводить входной контроль данного сырья.

Данные исследования дают основания рекомендовать штаммы *F. velutipes* выделенных в чистую культуру с карпофоров растущих на деревьях ботанического сада для промышленного культивирования как такие, которые характеризуются низкими значениями накопления тяжелых металлов в плодовых телах.

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОРМОВ С ПОМОЩЬЮ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *LENTINUS TIGRINUS*

Шутова В.В.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева
Саранск

Дереворазрушающие базидиомицеты являются важным звеном в цепи биологического разрушения органического вещества в природе. Они обладают полиферментными системами для деструкции как лигнина, так и целлюлозы. Базидиальные грибы расщепляют лигноцеллюлозный комплекс, используя 30-50 % целлюлозы и 20-40% лигнина. Базидиальные грибы приобретают все большее значение в хозяйственной деятельности человека, и в настоящее время наиболее быстро развивающимся направлением является применение этих микромицетов в медицине и пищевой индустрии. Одним из основных видов корма в зимних рационах скота является сено. Сено содержит 83% сухого вещества, 8,6% сырого протеина, 1,3 % сырого жира, 29,4 % сырой клетчатки, 38,2 % БЭВ, 5,6 % сырой золы. В абсолютно сухом веществе содержится 10,3 % сырого протеина и 35,4% сырой клетчатки.

Базидиомицеты способны разрушать лигноцеллюлозный комплекс соломы и обогащать этот субстрат белком. Активными продуцентами белка являются культуры *Lentinus tigrinus* и *Pleurotus ostreatus*. Рост лигноразрушающих грибов на сене практически не изучался, но оно имеет благоприятный химический состав для роста и развития высших базидиальных лигнинразрушающих грибов. Поэтому в нашей работе мы проводили твердофазное культивирование гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D на клеверотимофеечном сене с целью обогащения его белком в течение 15 суток.

Исследования показали, что *L. tigrinus* хорошо колонизировал субстрат. На вторые сутки роста гриба визуально обнаружили образование белого поверхностного мицелия. К 6 суткам роста произошло полное освоение субстрата. К 15 суткам мицелий оседал, появлялись коричневые капли экссудата.

В процессе культивирования гриб снижал содержание целлюлозы и лигнина. К 15 суткам роста потребление целлюлозы составило 33,1 %, лигнина 22 %. Количество редуцирующих веществ уменьшалось до 12 суток роста до 12 %, а потом практически не менялось.

При росте на сене *L. tigrinus* накапливал много белка, причем увеличение сырого протеина происходило в течение всего срока культивирования. К 15 суткам его количество увеличивалось почти в 4 раза по сравнению с исходным субстратом и составило 32,3 %.

Таким образом, гриб при росте на сене снижал количество трудноусваиваемых компонентов для крупнорогатого скота и обогащал субстрат сырым протеином. Поэтому он является перспективным штаммом для получения белковых кормов.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ЛИПИДЫ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Щерба В.В.¹, Бабицкая В.Г.¹, Пучкова Т.А.¹, Черноок Т.В.¹, Никитина В.Е.²,
Филимонова Т.В.¹, Осадчая О.В.¹

¹ – Институт микробиологии НАН Беларуси

² – Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Минск-Саратов

Отобраны грибы с высокой липидсинтезирующей активностью. Ими оказались *Ganoderma lucidum*, *Fomes fomentarius* – грибы, вызывающие белую гниль древесины, и *Laetiporus sulphureus* – бурую гниль древесины. Цель работы – дать характеристику липидных соединений глубинного мицелия отобранных грибов, изучить качественный и количественный состав нейтральных и полярных липидов. У всех изучаемых грибов количественно преобладала фракция нейтральных липидов (60,0-62,0% – у грибов белой гнили и 72,6% – у *L. sulphureus*). Изучение жирнокислотного состава обеих фракций показало преобладание в них диеновой C_{18:2} кислоты. Однако фракция полярных липидов по содержанию C_{18:2} кислоты значительно превосходила нейтральную (63,0-72,0%). Превосходит фракция полярных липидов нейтральную и по содержанию суммы полиненасыщенных жирных кислот и коэффициенту ненасыщенности. Фракционный состав нейтральных липидов изучался методом тонкослойной хроматографии. В качестве метчиков использовали эргостерин, линолевую кислоту и рафинированное подсолнечное масло, в составе которого имеется смесь триглицеридов высших жирных кислот. Исследования показали, что в составе нейтральных липидов грибов содержится широкий спектр соединений: моно-, ди- и триглицериды, свободные жирные кислоты, воска и эфиры стероидов. В составе нейтральных липидов *L. sulphureus* обнаружен ярко-красный пигмент, который в системе растворителей гексан : диэтиловый эфир : этанол (70:30:1) имеет R_f=0,058. В составе нейтральных липидов грибов *G. lucidum* и *F. fomentarius* в большом количестве отмечено присутствие резервных триацилглицеридов, меньшее – в липидах *L. sulphureus* (30,5-42,4% против 25,8%). В липидах всех изученных грибов содержатся стероиды, основным компонентом которых является эргостерин. Содержание его эргостерина в нейтральных липидах *G. lucidum* и *F. fomentarius* составило 14,8 и 12,5%, в липидах *L. sulphureus* – значительно меньше, 8,5%. Для базидиальных грибов характерно высокое содержание восков и эфиров стероидов (12,6-16,7%). У грибов *G. lucidum* и *F. fomentarius* диацилглицериды отнесены к минорным соединениям. Состав жирных кислот 2-х массивных фракций нейтральных липидов грибов (триацилглицеридов и свободных жирных кислот) имеют общие черты: основными являются пальмитиновая, линолевая и линоленовая кислоты. Содержание линолевой кислоты у *L. sulphureus* значительно ниже, также ниже у этого гриба сумма ненасыщенных жирных кислот и коэффициент ненасыщенности. Все исследуемые грибы обладают одинаковым качественным составом полярных липидов, который включает следующие фракции: лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилглицерин (ФГ), кардиолипид (КЛ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидная кислота (ФК). Количественное соотношение фракций фосфолипидов мицелия мало зависело от принадлежности грибов к различным экологическим группам. У *G. lucidum* и *F. fomentarius* – грибов белой гнили древесины, так же как и у *L. sulphureus* – гриба бурой гнили массивными оказались три фракции: ФХ, ФЭА и КЛ, хотя у *L. sulphureus* преобладал ФЭА, а у *G. lucidum* и *F. fomentarius* – ФХ. Разные фракции липидов характеризуются присутствием тех или иных жирных кислот. Насыщенные жирные кислоты преобладали в ФЭА (73,2-74,7%), ненасыщенные – в КЛ (50,2%). Что же касается ФХ, то соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот у всех грибов приблизительно одинаково.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ-РФФИ (грант № Б08Р-023).

ПИГМЕНТЫ ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Щерба В.В., Мишин Л.Т., Бабицкая В.Г., Черноок Т.В., Пучкова Т.А., Иконникова Н.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск

Для разделения пигментов гриба была использована система растворителей – гексан : диэтиловый эфир (3:1), которая позволила выявить 9 липофильных фракций, 3 из них были окрашены в желтый цвет. Первая оставалась практически на старте. Вторая имела $R_f=13$, третья – $R_f=46$. R_f бета-каротина в этой системе растворителей – 97, что свидетельствует в пользу предположения о некаротиноидной а ксантофиловой природе пигментов гриба. С целью предварительной идентификации пигментов и установления наличия в их структуре некоторых функциональных групп изучали изменение спектров разных фракций пигментов при обработке их соляной кислотой и боргидридом натрия. Тесты с этими реагентами позволяют выявить в структуре пигментов кислородсодержащие группы – оксо-, эпокси- или кетогруппы. Как оказалось, спектры всех 3-х фракций пигментов не изменяются после обработки последних соляной кислотой, что свидетельствует об отсутствии в их структуре эпоксидных групп. Иная картина наблюдалась при обработке боргидридом натрия. В этом случае наблюдали резкие изменения в характерах спектров всех трех фракций – сдвиг в коротковолновую сторону. Для многих каротиноидных соединений с сопряженными связями в молекуле характерным является наличие в спектре 3-х абсорбционных полос поглощения. Исследование структуры спектров поглощения пигментных фракций гриба показало, что 3-х пиковая (тонкая) структура отмечается у основной фракции при использовании в качестве растворителей диэтилового эфира или ацетона. В то же время в спектре хлороформенной фракции выявляется 2-х пиковость. В этиловом спирте полностью утрачивается тонкая структура спектра, выявляется одна полоса с максимумом поглощения в более длинноволновой области по сравнению с таким растворителем как диэтиловый эфир, в котором выявлялась тонкая структура спектра пигмента. Изучение спектров поглощения минорных фракций показало наличие слабовыраженных трехпиковых спектров независимо от используемого растворителя, что также свидетельствует об их каротиноидной природе.

Таким образом, на основании анализа полученных данных можно утверждать, что изучаемые пигменты, синтезируемые грибом *L. sulphureus*, относятся к каротиноидам. При этом пигмент, занимающий доминирующее положение в суммарной пигментной фракции экстракта, по своим спектральным характеристикам подтверждает факт наличия в его структуре кето-группы.

Полученные данные согласуются с исследованиями, проведенными ранее другими учеными, которые ярко-оранжевый пигмент из глубинного мицелия *L. sulphureus* идентифицировали как 8'-апо-бета-каротин-8'-овую кислоту, отнесли к каротиноидным пигментам и назвали лэтипороксантином. На протяжении многих лет лэтипороксантин был признан основным каротиноидным пигментом гриба. Следует, однако, отметить, что результаты, полученные немецко-итальянской группой ученых с использованием методов масс-спектрометрии и ЯМР, дали основание выделить пигменты *L. sulphureus*, названные ими «лэтипоровыми кислотами», в новый класс полиеновых соединений. Данные российских ученых также подтверждают каротиноидную природу пигментов гриба *L. sulphureus*.

Проведенные ранее исследования показали, что в мицелии гриба кроме каротиноидов содержатся другие физиологически активные вещества такие как, фосфолипиды, стерины, полиеновые жирные кислоты и др.

Есть все основания полагать, что именно соединения липофильной природы играют ведущую роль в проявлении высокой биологической активности исследуемого гриба.

СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Феофилова Е.П.

Институт микробиологии имени С.Н.Виноградского РАН
Москва

Одной из ключевых проблем современной биологии является вопрос – каким образом в процессе развития происходит образование морфологически одинаковых организмов, какие биохимические механизмы и какие клеточные структуры участвуют в этом процессе, который уже миллиарды лет протекает на нашей планете. Как показывают результаты исследований последних лет, растущая гифа мицелиальных грибов является уникальной моделью, позволяющей понять процесс формообразования клеток и то, как сохраняется в онтогенезе постоянство клеточной морфологии. Очень большой вклад в исследование этого феномена внесли данные по изучению состава и биологической функции клеточной стенки (КС) мицелиальных грибов.

КС растений была открыта в 1665 году, а КС грибов только в начале 18 столетия. Однако эта поверхностная клеточная структура длительное время практически не изучалась, так как считалось, что КС выполняет только «каркасную» функцию, и ее сравнивали со стенами дома, несущими опорную нагрузку. Но в начале 20 –го века отношение к КС резко изменилось, ее начали интенсивно исследовать, однако в основном у растений и бактерий. В настоящее время установлено, что эта поверхностная структура клетки несет полифункциональную нагрузку и выполняет такие важнейшие функции, как например защищает клетку от действия неблагоприятных факторов, контролирует морфогенез, участвует в процессах репродукции, определяет антигенные и адгезивные свойства. КС имеет чрезвычайно важное значение для всей клетки, так как ею определяется размер клетки и ее форма. Это не мертвая, неактивная структура, а живая, динамичная система, активно взаимодействующая с ниже лежащей протоплазмой и окружающей средой.

В настоящее время компоненты КС грибов разделили на структурные компоненты (хитин, β (1-3) – β (1-6) глюканы, β (1-4)глюкан (целлюлоза), и внутрискелетные, к которым стали относить маннопротеины, галакто-маннопротеины, ксило-маннопротеины, глюкуроно-маннопротеины и α (1-3)-глюкан. Структурный компонент – целлюлоза – характерен для хитридиевых грибов, которых по современной систематике относят к псевдогрибам. Моносахаридный состав КС включает глюкозу, маннозу, ксилозу, причем преобладающим сахаром является глюкоза, составляющая 68%. В состав КС грибов входят также аминокислоты, липиды (не более 3%) и N-ацетил-D –глюкозамин. Глюканы, например, 1,3- глюканы, образуют прочный комплекс с хитином, называемым хитин-глюкановым комплексом (ХГК), который составляет скелет грибной клетки. Этот комплекс присутствует в КС практически всех грибов за исключением зигомицетов, что служит надежным систематическим признаком. У некоторых грибов на поверхности КС обнаружен слизистый материал, состоящий из полисахаридов, представленных 1,3- β -глюканами, содержащими только глюкозные единицы, соединенные β -1,6- связями с каждой третьей единицей глюкозы по длине основной цепи. На внешней поверхности КС гифы присутствует S-глюкан, состоящий исключительно из 1,3-связанных глюкозных остатков и особые белки, называемые гидрофобинами, а также пигменты фенольной природы – меланины.

Основным полисахаридом КС грибов является хитин (поли –N- ацетил-D-глюкозамин). Это широко распространенный в природе биополимер, по ряду своих физико-химических свойств напоминающий целлюлозу. В природе хитин не присутствует в чистом виде, а как и другие биополимеры связан ионными или ковалентными связями с другими соединениями. Как отмечалось выше, у грибов хитин связан с глюканами, в кутикуле насекомых хитин связан с меланином, в панцире ракообразных – с белками –

артроподином и склеротином. Содержание хитина значительно выше в панцире крабов, чем в КС грибов, и составляет от 30 до 50%.

В дальнейшей части доклада обсуждается феномен апикального роста грибной гифы, который позволяет понять, почему только грибы способны расти со скоростью 100 мкм в минуту и накапливать уникально большую биомассу. Этот процесс требует поддержания высокой активности специальных везикул - актиновых филаментов и микротрубочек, интенсивного процесса биосинтеза и высокую активность механизмов вторичного транспорта субстратов. На верхушке гифы непрерывно происходит синтез новой КС и выделяются ферменты, переваривающие субстраты. Все эти процессы роста КС координируются особыми образованиями – Центрами агрегации везикул, которые контролируют также скорость движения везикул, и, тем самым, определяют морфологию растущей гифы: чем ниже скорость движения везикул, тем овальнее становится растущая клетка, гифы же образуются только при очень высокой скорости перемещения везикул. Рост грибной гифы можно сравнить с проталкиванием живого вещества вперед по туннелю, который строится самой гифой, и который выдерживает давление 4-18 атмосфер и построен из хитина.

В заключительной части доклада обсуждается значение современных знаний о составе КС грибов для развития биотехнологии. КС мицелиальных грибов используются при: получении в ферментерах биомассы в виде пеллетов или аморфного мицелия, определении состояния и годности посевного материала, получении лекарственных препаратов из структурных полисахаридов КС – хитина и глюканов, в ряде отраслей медицины (офтальмологии, комбустиологии и др.), а также в сельском хозяйстве, в бумажной, текстильной промышленности и машиностроении.

Тезисы поддержаны грантом РФФИ № 09-04-00430.