

Грибные биотехнологии в медицине и промышленности

Fungal biotechnology for medicine and industry

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА КУЛЬТУРЫ ГРИБА *PL. OSTREATUS* (JACQ. :FR.) KUMM.

Авагян И. А., Нанагюлян С. Г., Баласанян М. Г., Жамгарян А. Г.

ЕГУ, факультет биологии, Ереван

ЕрГМУ имени М. Гераци, факультет фармакологии, Ереван

Высшие базидиальные грибы обладают не только большой питательной ценностью, но также служат источником биологически активных веществ. Ранее нами было исследовано воздействие крайне высоких частот ЭМИ на рост и ферментативную активность культуры дереворазрушающего гриба. Поскольку исследуемый нами гриб является дереворазрушающим, то в составе вторичной клеточной оболочки содержит хитин, глюканы и лигнин, а также богат бетта-глюкозидазами и различными пероксидазами, необходимыми для их синтеза и расщепления. Поэтому нами было предположено, что трис-экстракт из свежей культуры гриба *Pleurotus ostreatus*, будет эффективен в использовании его как противовоспалительное средство. Исходя из исследований, при определенных длинах мм-волн некоторые из ферментов активируются. Все вышеуказанное явилось основанием для исследования противовоспалительной активности чистых культур *Pleurotus ostreatus* с модулированной ферментативной активностью.

Исследования по определению противовоспалительной активности экстракта гриба, проводилось на модели, индуцированного ксилолом острого воспаления уха на белых беспородных крысах-самцах весом 150 – 180 г. Внутривнутрибрюшинное введение экстракта в дозе 2,5 мл/кг приводит к уменьшению индуцированного ксилолом отека по сравнению с контролем до 86 %. Это свидетельствует о том, что экстракт гриба обладает выраженной противовоспалительной активностью, которая по всей вероятности обусловлена наличием выявленных в экстракте ферментативных систем, которые согласно литературным данным проявляют выраженную антиоксидантную активность и возможно ингибируют активность ферментов, участвующих в синтезе и биотрансформации простагландинов.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ТРУТОВИКА ЛАКИРОВАННОГО *GANODERMA LUCIDUM*

Автономова А. В.¹, Евсенко М. С.¹, Усов А. И.², Исакова Е. Б.¹, Бухман В. М.¹, Леонтьева М. И.¹, Седакова Л. А.³, Трещалина Е. М.³, Краснополянская Л. М.¹

¹ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

² Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, Москва

³ НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ имени Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Ganoderma lucidum (Curt. : Fr.) P. Karst., трутовик лакированный – широко известный лекарственный базидиальный гриб. *G. lucidum* используют в традиционной медицине Юго-восточной Азии более двух тысяч лет в качестве эффективного тоника, препарата, увеличивающего продолжительность жизни и улучшающего ее качество, противоопухолевого средства, при лечении бронхитов. Интенсивные исследования свойств плодовых тел и мицелия этого гриба позволили обнаружить у него иммуномодулирующие, противоопухолевые, гепатопротекторные, генопротекторные, противовирусные, антиоксидантные, гипогликемические и гиполипидемические свойства, способность регулировать деятельность сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем. Из *G. lucidum* выделены активные метаболиты, относящиеся к различным классам соединений: полисахариды, тритерпены, белки, жирные кислоты, нуклеозиды и др. Полисахариды *G. lucidum* способны оказывать выраженное противоопухолевое действие.

G. lucidum культивировали в погруженных условиях в колбах по разработанным способам для каждого изученного штамма. В опытах *in vivo* на моделях перевиваемых опухолей была продемонстрирована противоопухолевая активность трех штаммов *G. lucidum* из рабочей коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИНА имени Г. Ф. Гаузе РАМН. Было изучено действие погруженной культуры, водных

экстрактов мицелия, водорастворимых и щелочерастворимых полисахаридных фракций мицелия, индивидуальных полисахаридов. Сублимированная погруженная культура штамма 5 *G. lucidum* достоверно тормозила развитие Т-клеточного лимфолейкоза Р388 на 50%. Водные экстракты сухого мицелия *G. lucidum* штаммов 4, 5 и 10 проявляли невысокую противоопухолевую активность, тормозили рост опухоли на 20-50%. Выделенная водорастворимая полисахаридная фракция из водного экстракта мицелия штамма 5 обладала стабильным и достоверным противоопухолевым эффектом в отношении Т-клеточного лимфолейкоза Р388, аденокарциномы Са755 и саркомы 180 при пероральном введении. ТРО этой фракции составляло 55-78%. Из суммарной фракции водорастворимых полисахаридов мицелия штамма 5 *G. lucidum* были выделены три фракции. Эти фракции проявляли одинаковую невысокую противоопухолевую активность в отношении лимфолейкоза Р388. ТРО составляло 23-56%. Щелочерастворимые фракции полисахаридов из погруженного мицелия штамма 5 *G. lucidum* оказывали торможение роста опухоли на 34-50%. Из одной из щелочерастворимых фракций мицелия *G. lucidum* были выделены индивидуальные полисахариды фукогалактан и ксиломаннан, обладающие противоопухолевой активностью. Фукогалактан при пероральном введении демонстрировал противоопухолевое действие на модели аденокарциномы Са 755. ТРО через неделю после окончания лечения составляло 93%. Ксиломаннан оказывал выраженное противоопухолевое действие на моделях различных линий опухолей с коэффициентом торможения роста опухоли до 99-100%.

СКРИНИНГ МЕЗО- И ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ, СПОСОБНЫХ К РАСЩЕПЛЕНИЮ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

**Айзенберг В. Л.¹, Стойко В. И.¹, Курченко И. Н.¹, Капичон А. П.¹,
Омельчук Е. А.², Красинько В. О.², Твердохлиб И. А.², Иванов А. А.²**

¹ **Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев**

² **Национальный университет пищевых технологий, Киев**

Ежегодно в результате фиксации солнечной энергии образуется приблизительно $4 \cdot 10^{11}$ тонн растительной биомассы, состоящей, в основном, из целлюлозы (Рабинович, 2006). Среди большого разнообразия микроорганизмов, участвующих в расщеплении целлюлозы, одну из ведущих ролей играют микроскопические грибы. Селекция микромицетов – активных продуцентов целлюлаз, участвующих в микробной конверсии целлюлозосодержащего растительного сырья, – актуальная биотехнологическая задача.

Цель настоящей работы состояла в исследовании способности микромицетов разного таксономического положения к расщеплению целлюлозы.

Проведена оценка способности к росту на минеральной среде Чапека с фильтровальной бумагой в качестве источника углерода у 138 штаммов 44 видов 23-х родов мезо- и термотолерантных микромицетов в стационарных условиях. Рост грибов оценивался по критериям: интенсивность роста, наличие спороношения, возникновение просветления и разрывов субстрата.

Показано, что для 21% исследованных штаммов характерен умеренный и интенсивный рост на фильтровальной бумаге; для 46% – удовлетворительный; 15% штаммов не способны к росту на целлюлозосодержащем субстрате. Установлено, что термотолерантные штаммы отличаются от мезофильных большей интенсивностью роста. Так, у *Thielavia* sp. 1915 интенсивный рост мицелия отмечен уже на 7-ые сутки культивирования. Однако, такие термотолерантные микромицеты, как *Rhizomucor pusillus* (8 штаммов) и *Thermoascus aurantiacus* (7 штаммов) вообще не росли на среде с фильтровальной бумагой. При этом большинство представителей термотолерантных грибов рода *Thielavia* характеризовались интенсивным ростом на целлюлозосодержащем субстрате, но без разрыва фильтровальной бумаги. В то же время у некоторых умеренно растущих на субстрате штаммов микромицетов зафиксированы просветления и даже разрывы фильтровальной бумаги. Таким образом, в результате первоначального скрининга для дальнейших исследований отобрано 11 штаммов мезофильных микромицетов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium* и 20 штаммов термотолерантных микромицетов – представителей родов *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Emericella*, *Melanocarpus*, *Thielavia*.

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КОМПОЗИЦИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИПИД- И ПОЛИСАХАРИДСИНТЕЗИРУЮЩИХ ГРИБОВ

**Бабицкая В. Г., Иконникова Н В., Пучкова Т. А., Осадчая О. В., Филимонова Т. В.
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск**

Оценка биохимического состава глубинного мицелия базидиальных грибов позволяет судить о его высокой биологической ценности. Учитывая значимость ряда биологически активных соединений, в т. ч. эссенциальных полиеновых жирных кислот, фосфолипидов, провитаминовых соединений, а также полисахаридов в жизнедеятельности организма человека и животных, возможно создание комплексных препаратов широкого спектра действия с функционально-корректирующими свойствами на основе биомассы глубинного мицелия как отдель-

ных грибов-продуцентов, так и специально составленных композиций из них, взаимодополняющих и усиливающих действие друг друга.

Целью настоящей работы явилась разработка композиций функционально-корректирующих препаратов на основе мицелия липид- и полисахаридсинтезирующих грибов. Для разработки композиций использовались следующие грибы: *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus* и *Cordyceps militaris*.

Ранее нами показано, что наибольшей липидсинтезирующей способностью в условиях глубинного культивирования характеризуются *L. sulphureus* БИМ F-361 Д и *C. militaris* БИМ F-372 Д. Содержание липидов в их мицелии достигает 20,0-26,0%. Кроме того, *G. lucidum* БИМ F-325 Д и *C. militaris* БИМ F-372 Д синтезируют значительное количество полисахаридов, а *L. sulphureus* БИМ F-361 Д – до 12-13 мг/г каротиноидов. Присутствие фенольных соединений в большом количестве отмечено у *L. sulphureus*. Повышенный уровень фенольных и полиеновых соединений – фосфолипидов, линолевой кислоты, а также каротиноидов обеспечивает высокую антиокислительную активность экстрактов грибов (78-95% от антиокислительной активности ионола). Анализ жирнокислотного состава липидов исследуемых грибов показал преобладание в них эссенциальных ненасыщенных жирных кислот, сумма которых составила 83,0-88,0%. Количество линолевой кислоты достигало 57,0-77,0%.

Наличие в составе мицелия исследованных грибов уникального комплекса биологически активных соединений явилось основанием разработки композиций функционально-корректирующих препаратов. Создано 4 композиции на основе грибного мицелия (соотношение компонентов в каждой 1:1):

- 1 – *C. militaris* БИМ F-372 Д + *G. lucidum* БИМ F-325 Д;
- 2 – *G. lucidum* БИМ F-325 Д + *L. sulphureus* БИМ F-361 Д;
- 3 – *C. militaris* БИМ F-372 Д + *L. sulphureus* БИМ F-361 Д;
- 4 – *C. militaris* БИМ F-372 Д + *G. lucidum* БИМ F-325 Д + *L. sulphureus* БИМ F-361 Д.

Биохимический анализ состава грибных композиций показал, что за счет глубинного мицелия *L. sulphureus* в композициях увеличилось содержание липидов, появились каротиноиды, но несколько уменьшилось количество полисахаридов. В некоторых композициях увеличилось содержание фенольных соединений: во 2-й – 2500-3000 мг%, 3-й – 2400-2800 мг%. Антиоксидантная активность оставалась на достаточно высоком уровне и составляла 78,0-90,0%. Изучение жирнокислотного состава композиций показало, что сумма ненасыщенных жирных кислот составляла 82,0-86,0%, доля линолевой кислоты $C_{18:2}$ – 64,0-75,0%.

СТАБИЛЬНОСТЬ ВАЖНЕЙШИХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОМПОЗИЦИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО-КОРРЕКТИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ

**Бабицкая В.Г., Черноок Т.В., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Иконникова НВ.
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск**

Исследования, направленные на создание принципиально новых препаратов с высокой пищевой и биологической ценностью, способствующие повышению функциональных ресурсов человека, его работоспособности, качества жизни и устойчивости к действию факторов внешней среды, являются весьма актуальными. Основой таких препаратов, как показывает мировая практика, становятся базидиальные грибы, синтезирующие комплекс биологически активных веществ, в т. ч. липидной и углеводной природы. Высокомолекулярные углеводы – полисахариды широко применяются при создании лечебно-профилактических средств, данные же об использовании не менее ценных липофильных соединений грибов весьма ограничены.

На основе глубинного мицелия грибов *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus* и *Cordyceps militaris* разработаны композиции функционально-корректирующих препаратов, характеризующиеся высоким содержанием липидов, фосфолипидов, полисахаридов, каротиноидов, фенольных соединений (соотношение компонентов в каждой композиции 1:1):

- 1 – *C. militaris* + *G. lucidum*
- 2 – *G. lucidum* + *L. sulphureus*
- 3 – *C. militaris* + *L. sulphureus*
- 4 – *C. militaris* + *G. lucidum* + *L. sulphureus*

Изучение стабильности биохимического состава грибных композиций в процессе хранения в течение 12 месяцев показало, что существенного изменения их основных показателей практически не наблюдалось. На одном уровне оставались: количественное содержание белка, липидов, фосфолипидов, полисахаридов, эргостерина, фенольных соединений, а также влажность и антиокислительная активность. Вместе с тем в композициях 2, 3 и 4 значительно снизилось содержание каротиноидов, роль которых как для животных, так и для человека несомненно велика. Каротиноиды имеют существенный недостаток – нестабильность и могут подвергаться разложению под действием многих факторов, в первую очередь кислорода воздуха, а также УФ-света. Для предупреждения окисления каротиноидов используют антиоксиданты, такие как ионол, бутилоксианизол, бутилокситолуол и др. Однако применение их ограничивается ввиду токсичности для человека. Поэтому чаще в качестве ан-

тиоксидантов используют аскорбиновую кислоту. Показано, что обработка сырого мицелия гриба перед сушкой аскорбиновой кислотой в концентрации 10^{-1} М позволяет сохранить количество каротиноидов в липокаротиноидном комплексе при хранении его на 50, 0-60, 0%.

Установлено, что в процессе хранения композиций произошли изменения в составе жирнокислотного состава липидов. Известно, что грибы являются одним из источников ненасыщенных жирных кислот, ряд из которых – эссенциальные. Они не синтезируются в организме человека, но являются необходимыми для образования других полиненасыщенных кислот. Хранение композиций привело к увеличению пальмитиновой кислоты и перестройке между олеиновой и линолевой кислотами: количество олеиновой кислоты в композиции 1 увеличилось с 19, 0 до 29, 0%, в композиции 2 – с 6, 0 до 14, 0-16, 0%, в композиции 3 – с 20, 0 до 27, 0-30, 0% и в композиции 4 – с 15, 0 до 20, 0-21, 0%. Количество линолевой кислоты уменьшилось соответственно с 64, 0 до 49, 0, с 75, 0 до 60, 0-62, 0, с 65, 0 до 50, 0 и с 69, 0 до 54, 0%. Однако во всех композициях преобладающими были ненасыщенные жирные кислоты, составившие 77, 0-79, 0%. Отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным находилось в пределах 3, 4-3, 7.

ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ФЕРМЕНТИРОВАННОГО СУБСТРАТА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Бандура И. И., Миронычева Е. С.

Таврический государственный агротехнологический университет, Мелитополь

Стандартным сырьем для культивирования ксилотрофных базидиомицетов в Юго-Восточном регионе Украины является пшеничная, режа - ячневая солома и лузга подсолнечника. Солома обычно заготавливается в период сбора зерновых (июль-август) в объеме годовой потребности, лузга – на протяжении года поступает с перерабатывающих предприятий. Влажность заготавливаемого сырья является одним из самых важных показателей, который определяет технологию хранения сырья и последующую его термическую обработку в процессе изготовления субстрата для культивирования грибов. Определено, что влажность сырья, закладываемого на хранение, не должна превышать 12%. За время хранения влажность сырья возрастает до 15-25% к марту следующего года. Это стимулирует развитие плесневых грибов родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium* – конкурентов культивируемых базидиомицетов. Повышение титра спор вышеперечисленных микроорганизмов к весне бывает настолько велико, что процент пораженных субстратных блоков возрастает до 20% (в случае ферментационной термообработки) и до 100% (в случае ксеротермической или гидротермической подготовки субстрата). Это приводит к высоким экономическим потерям, а, порой, и к полному закрытию грибного предприятия. Применение фунгицидных препаратов дает положительный эффект, но значительно удлиняет сроки инкубации блоков и увеличивает себестоимость грибов.

Микробиологический тест-контроль качества субстрата дает возможность откорректировать технологическую схему приготовления субстрата в течение 1-3 циклов термообработки при всех используемых способах подготовки сырья. Для тестирования мы используем стандартную камеру Горяева (величина 1 клетки 1/400 мл), смыв субстрата (10 г субстрата на 50 мл дистиллированной воды)

Так при исследовании обработки сырья (начальная влажность 11%, состав – 100% лузга) методом гидротермии (выдерживание сырья в воде температурой 80°C в течение 3, 5 часов) в варианте, показавшем удовлетворительную обработку, наблюдалось до 10 КОЕ в 1/400 мм. Количество нестандартных блоков составило 5%. При неудовлетворительной гидротермической обработке (2 часа при температуре воды 80°C) наблюдался живой мицелий конкурентной плесени, в 1 клетке сетки камеры Горяева более 20 разнообразных микроорганизмов. До изменения режима обработки количество нестандартных блоков доходило до 25%, а после изменения снизилось до 8%.

При обработке сырья (влажность 12%, общий состав - лузга -85%, солома -15%) методом ксеротермии (обработка сухим паром 100-105°C в течение 6-7 часов) в первый день наблюдалось не более 4-х КОЕ на 1/400мм, а на второй день было отмечено развитие клеток *Saccharomyces* из-за высокого содержания легкодоступных сахаров после длительной высокотемпературной обработки. Наличие нестандартных блоков было на уровне 5%

При обработке субстрата (влажность сырья - 12%, состав: 75% -лузга, 25% - пшеничная солома) методом твердофазной ферментации в течение 36 часов нестандартных блоков не наблюдалось.

При начальной влажности сырья 16-18% и подготовке субстрата методом ферментации количество нестандартных блоков составило 7%. В таких случаях рекомендуется увеличение фазы1 термообработки субстрата, предполагающей выдерживание увлажненного сырья при температуре до 60°C в течение 12-16 часов.

Отдавая предпочтение пастеризационным процессам подготовки субстрата, обеспечивающим его высокую селективность, мы рекомендуем использовать тоннели или камеры ферментации для термической обработки сырья. Исследование работы таких камер объемом до 5 тонн в течение 5 лет приводит к заключению о необходимости постоянной корректировки графика термообработки в зависимости от начальных показателей влажности сырья. Это обеспечивает высокое качество субстрата для культивирования съедобных грибов *Pleurotus* и *Lentinula* в течение всего года.

ПЛЕОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ СТАТИНОВ, ОБРАЗУЕМЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ**Баранова Н. А., Крейер В. Г., Осмоловский А. А., Пискункова Н. Ф., Кураков А. В., Егоров Н. С.****Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова**

Природные статины ловастатин (мевинолин, монаколин К) и компактин (ML-236B, мевастатин) образуются мицелиальными грибами, представителями родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Hypomyces*, *Phoma*, *Deratomyces*, *Gymnoascus* и *Menascus*.

Статины используются в медицине в качестве препаратов («Мевакор», «Зокор» и др.), снижающих уровень холестерина в плазме крови и липопротеины низкой плотности (ЛНП), так как являются конкурентными ингибиторами ключевого фермента биосинтеза холестерина – гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы. Однако, в результате длительных клинических исследований было установлено, что статины не только ингибируют биосинтез холестерина, но также дают положительный эффект при воспалениях и ряде заболеваний, связанных с процессами старения. Статины оказывают стимулирующее влияние на синтез оксида азота (NO) и дают положительный эффект при таких заболеваниях как инсульт, болезнь Альцгеймера и некоторых онкологических заболеваниях.

Кроме того, статины проявляют антитромботические и протромболитические свойства. Статины снижают уровень тканевого фактора (TF), что приводит к уменьшению образования тромбина и ингибитора активатора плазминогена первого типа (PAI-1), в результате чего активизируется образование плазмينا. Возможно, механизм действия статинов состоит в ингибировании фарнезилпирофосфата и геранил-геранилпирофосфата, участвующих в пренилировании сигнальных белков.

Показано, что у низших эукариот – мицелиальных грибов, в частности – у *Penicillium chrysogenum* ловастатин в форме гидроксикислоты не влияет на образование протеолитических ферментов, а в лактонной форме полностью ингибирует протеолитическую активность.

Представители *P. chrysogenum* известны как продуценты пенициллина. Изучение действия ловастатина в лактонной форме и форме соответствующей гидроксикислоты на антибиотическую активность *P. chrysogenum* с использованием в качестве тест-организма *Staphylococcus aureus* (из Коллекции микроорганизмов КМ МГУ) показало, что ловастатин в форме гидроксикислоты увеличивает выход антибиотика исследуемым штаммом, тогда как ловастатин в лактонной форме неактивен.

Изучение влияния ловастатина на биосинтетическую активность микромицета *Aspergillus terreus* – продуцента ловастатина, показало, что ловастатин, добавленный в среду культивирования вместе с посевным материалом существенно влияет на образование вторичных метаболитов микромицетом, в значительной степени изменяя качественный и количественный состав образуемых веществ.

Следует отметить, что ловастатин в испытанных концентрациях, вызывая существенные изменения в биохимической активности исследуемых микромицетов, не влияет на рост продуцентов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ *AMARANTUS CAUDATUS* L. В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ**Бисько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподерова Т. А., Иванова Т. С.****Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев**

Последнее время культурные виды амаранта вызывают интерес исследователей разных областей науки. Особое внимание отводится ценной кормовой, лекарственной, пищевой, зерновой, овощной, технической культуре *Amarantus caudatus* L. и продуктам ее переработки – муке, криопорошкам, экструдатам, солоду, крахмалу, маслам, экстрактам, в том числе углекислотным. Особенности углекислотной экстракции семян амаранта позволяют сохранить почти весь уникальный водорастворимый витаминный, микроэлементный, белковый комплекс побочного продукта экстракции – шрота, что позволяет рассматривать его как потенциальный дешевый и качественный субстрат для культивирования грибов разных экологических групп.

Целью нашей работы было изучение особенностей роста грибов и синтеза полисахаридов при культивировании на муке из шрота и семенах амаранта.

Исследование роста 18 видов съедобных и лекарственных грибов на продуктах переработки семян *A. caudatus* позволили отобрать для последующих экспериментов виды грибов *Pleurotus ostreatus* (Jacq. :Fr.) Kumm., *Schizophyllum commune* Fr., *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst., *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., накапливающих наибольшую биомассу.

В ходе работы была установлена зависимость синтеза биомассы и полисахаридов от вида культивируемого гриба и состава питательной среды, что согласуется с данными литературы. На обоих исследованных субстратах наиболее активно рос *S. commune*. Снятая на 14 сутки роста биомасса этого гриба на среде с семенами амаранта составила 17,5 г/л, а на муке из шрота – 12,6 г/л. Количество биомассы других исследованных видов, кроме *G. lucidum*, полученной на среде с семенами амаранта, было значительно меньше, чем при использовании муки из шрота: у *P. ostreatus* – на 53 %, *C. sinensis* – на 61 %.

Культивирование грибов на муке из шрота амаранта способствовало синтезу максимального содержания эндополисахаридов у *G. lucidum* (9,7%). В биомассе *C. sinensis*, *P. ostreatus*, *S. commune* количество эндополисахаридов соответственно было в 1, 3, 3, 7 и 19 раз меньше, чем в мицелиальной массе *G. lucidum*. На питательной среде с семенами амаранта наибольшее количество эндо- и экзополисахаридов (8,4% и 11,8 г/л соответственно) было характерно для *C. sinensis*. Для других исследованных видов, за исключением *G. lucidum*, на среде с семенами амаранта, в сравнении с использованием муки из шрота в качестве растительной основы питательной среды, отмечено увеличение содержания эндополисахаридов: у *S. commune* – в 8 раз, а у *P. ostreatus* – в 1,8 раза. Содержание экзополисахаридов в культуральной жидкости *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *S. commune*, в сравнении с *C. sinensis*, было меньше в 1, 7; 8, 4; 23, 6 раза соответственно.

В процессе культивирования грибов на среде с мукой из шрота амаранта значение pH питательной среды изменялось: в результате жизнедеятельности *S. commune* и *C. sinensis* оно увеличивалось с 6,0 до 7,5, а в случае роста *P. ostreatus* и *G. lucidum* показатель pH уменьшился до 5,5. Исходный уровень кислотности (pH 7,0) питательной среде с семенами амаранта в зависимости от исследованного видов гриба уменьшился на 0,5–2 единицы.

Результаты проведенных исследований использования семян и муки из шрота амаранта в качестве субстрата для выращивания *P. ostreatus*, *S. commune*, *G. lucidum*, *C. sinensis* свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения процессов метаболизма и синтеза биологически активных веществ этими видами грибов на вышеуказанных субстратах.

О ПРОБЛЕМАХ, СВЯЗАННЫХ С РАЗРАБОТКОЙ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НЕМАТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ АНАМОРФНЫХ ГРИБОВ ПРОТИВ ЗЛОТИСТОЙ КАРТОФЕЛЬНОЙ НЕМАТОДЫ

Бутов Е. В.¹, Борисов Б. А.², Приданников М. В.²

1 - Российский гос. аграрный заочный университет, Балашиха

2 - Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, Москва

В отличие от колорадского жука второй по значимости вредитель картофеля в России – цистообразующая золотистая картофельная нематода (далее – ЗКН) *Globodera rostochiensis* – очень мелкий скрытно живущий объект, развивающийся на корнях и клубнях. Активных мер борьбы с ЗКН не существует. Определенный положительный эффект дают лишь севообороты и использование относительно устойчивых сортов. В этой связи представляет интерес разработка биопрепаратов на основе инфекционных спор (конидий) некоторых нематодопаразитических анаморфных грибов, которые в дикой природе и агроценозах способны спонтанно истреблять разные виды цистообразующих нематод (свекловичную *Heterodera schachtii*, соевую *H. glycines*, хмелевую *H. humuli*, люцерновую *H. medicaginis* и мн. др.). К грибам этой группы относятся, прежде всего, представители родов *Paecilium*, *Pochonia*, *Paranomuraea*, *Haptocillium*, *Lecanicillium*, *Hirsutella*. В России, однако, подобные исследования фактически не проводились.

У ЗКН зрелые цисты (коричневые) формируются с конца июля до середины сентября и сохраняются зимой в почве до глубины 40 см. В каждой цисте содержится в среднем около 250 яиц и личинок (максимум – до 1000). Последние с конца мая до середины лета асинхронно выходят в почву и внедряются в корни, причём, ещё при температуре 10-12°C.

С учётом сказанного представляется очевидным следующее:

- Внесение биосредства в почву должно быть приурочено ко времени послеуборочной обработки почвы с расчётом на развитие массовой инфекции осенью и весной, т. е. до начала внедрения инвазионных личинок в корни.

- При скрининге штаммов в первую очередь заслуживают внимания те, которые способны успешно преодолевать мощный барьер, которым является оболочка цисты, и лишь затем внутри неё осуществлять активное заражение яиц и личинок, причём, при температуре, по меньшей мере, около 14-17°C. Отсюда вытекает целесообразность направленного поиска подобных высокоадаптивных изолятов в природных условиях высоких широт (например, в Мурманской, Архангельской областях, на севере республики Карелии и т. п.) и, возможно, в высокогорьях Кавказа. Заслуживают внимания данные (Zare, Gams, Evans, 2001 // Nova Hedwigia, 73, 1-2: 51-86), что способностью развиваться при пониженных температурах отличаются виды *Pochonia suchlasporia* и *P. goniooides*, обладающие овицидной активностью; а среди видов, поражающих личинок, – *Haptocillium balanoides*.

- Растянутасть периода выхода личинок из цист указывает на то, что весной перед посадкой клубней с большой вероятностью потребуется второе внесение для уничтожения подвижных особей, ранее избежавших гибели внутри цист. Однако в этом случае нужны ларвицидные виды (штаммы).

- По предварительным данным, высокоэффективная инфекционная нагрузка может составлять порядка 20...50 конидий/мм³ почвы (? [2, 4...6]Ч10⁴ кон./г ? [8...20]Ч10¹³ кон./га). Чтобы применение в таких дозах было экономически оправданным, биопрепарат должен обладать не просто высокой нематоцидной активностью, подобной действию химических средств, а обеспечивать длительное, не менее чем на 3-4 года, цепное развитие эпизоотического процесса. В связи с этим особое внимание должно быть обращено на отбор штаммов, способных продуцировать на трупах нематод в почве максимально возможное количество дочерней инфекции.

- Разумеется, что штаммы, отвечающие указанным требованиям, должны быть технологичными при массовом культивировании на питательных средах.

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ СТАДИИ КОРИЧНЕВОЙ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ ПЛОДОНОШЕНИЮ *LENTINUS EDODES*

Ветчинкина Е. П., Селиванов Н. Ю., Никитина В. Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Благодаря наличию уникального комплекса биологически активных соединений, содержащихся в мицелии и плодовых телах съедобного культивируемого гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитак), данную культуру используют как ценное сырье для получения ряда высокоэффективных медицинских препаратов и биологически активных добавок. Немаловажным также является факт, что шиитак относится к грибам ксилотрофам и для его культивирования можно использовать отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности.

Отличительной чертой этого базидиомицета является формирование в процессе развития плотной структуры, представляющей собой сплетение толстостенных меланизированных гиф, образующейся поверх нежного непигментированного мицелия. В процессе эволюции мицелиальная пленка, по всей вероятности, появилась как защитный механизм, предохраняющий мицелий и формирующиеся плодовые тела от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Пигменты устраняют избыток освещения, способствуют снижению проницаемости клеточных стенок для токсичных веществ и патогенов. Нами было отмечено, что у некоторых штаммов шиитака формирования полноценных плодовых тел происходит только после образования коричневой мицелиальной пленки.

Биохимический анализ биополимеров клеток данной морфологической структуры, предшествующей плодоношению *L. edodes*, выявил, наличие набора специфичных белков, обладающих выраженной функциональной активностью и отсутствующих на других стадиях развития базидиомицета. Анализ внутриклеточных белков проводили методами ВЭЖХ анионообменной хроматографии на колонке TSK Bioassist Q и электрофореза в ПААГ при не денатурирующих условиях.

Нами установлено, что наиболее характерными для данной стадии морфогенеза являются белки, выходящие с колонки при концентрации соли NaCl 0,3 – 0,5 М, молекулярной массой 94 и 97 кДа, а также 70, 80, 110, 130 и 150 кДа. Из них три белка, молекулярной массой около 100 кДа каждый, являются оксидазами и обладают лакказной активностью. Ферментативную активность определяли спектрофотометрически, по способности белков окислять ряд субстратов: АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)), диметоксифенол и сирингалдазин. Ранее нами было показано, что перед началом образования базидиом *L. edodes* имеются существенные отличия по составу и активности ферментов фенолоксидазного комплекса, в частности лакказ. Предположительно фенолоксидазы, необходимые ксилотрофам для разрушения лигниновых компонентов древесины, могут также принимать участие в процессе морфообразования.

На стадии коричневой мицелиальной пленки нами были выявлены лектины, характерные только для данного этапа развития грибной культуры. Показано, что белки молекулярной массой около 130 и 150 кДа являются гемагглютинидами, специфичными к L-D-меллибиозе. Важно отметить высокую активность данных лектинов, соответствующую титрам гемагглютинации 1:32768 и 1:65536. Возможно, что переход от одной стадии развития базидиомицета к другой регулируется присутствием и активностью в клеточных структурах маркерных молекул, обладающих выраженной углеводной специфичностью. Кроме того, ряд исследований говорит о том, что лектины играют важную роль в регуляции деятельности ферментных систем.

Появление определенных функциональных белков перед стадией плодоношения может свидетельствовать о важной роли данных молекул в инициации и формировании базидиом *L. edodes*.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА MELOBASS, ПС. (*BEAUVERIA BASSIANA* BALS. 10-06) ПО ОТНОШЕНИЮ К *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH.

Войтка Д. В., Кондратенко Т. П., Прищеп Л. И.

РУП Институт защиты растений, Прилуки

Использование микроорганизмов в качестве основы биологических препаратов для защиты растений от вредителей является перспективной альтернативой химическим пестицидам. При интенсификации защитных мероприятий в ряде тепличных хозяйств наблюдается формирование резистентных к пестицидам популяций вредителей. Неизбежным следствием этого часто является полная потеря эффективности используемого препарата. В настоящее время ведется поиск эффективных экологически безопасных средств защиты от фитофагов в закрытом грунте.

В РУП «Институт защиты растений» (Беларусь) на основе штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* Bals. 10-06 с целью контроля численности майских хрущей создан препарат Melobass, титр пс. 6 млрд спор/мл. В связи с тем, что гриб *Beauveria bassiana* Bals. обладает высоким потенциалом биологической активности и широким спектром действия на вредителей, нами была оценена биологическая активность препарата по отношению к обыкновенному паутиному клещу (*Tetranychus urticae* Koch.) – одному из наиболее вредоносных фитофагов в закрытом грунте.

Оценка биологической активности препарата Melobass, пс. по отношению к обыкновенному паутиному клещу проведена в широком диапазоне концентраций рабочей жидкости - от 0,05 до 10%. В качестве эталона использовали препарат акарин, КЭ, 0,2%, в концентрации рабочей жидкости 0,1%. Учеты численности имаго и яиц клеща проводили на 3-и, 7-е, 14-е сутки после обработки. Биологическую активность препарата оценивали по гибели фитофагов по методике Abbott (1925).

Нами выявлена существенная корреляционная зависимость между концентрацией препарата и его биологической активностью по отношению к яйцам ($r=0,73$) и подвижным стадиям клеща (личинкам, нимфам и имаго) ($r=0,99$). Высокая биологическая активность Melobass, пс. была отмечена при концентрации препарата 0,5% на 7-е сутки после обработки. Кроме высокой смертности подвижных стадий развития фитофага, достигавшей 86,4%, наблюдали также гибель яиц - 98,7%. Применение препарата акарин, КЭ, 0,2% обеспечило снижение численности подвижных стадий на 100%, а яиц - лишь на 34,7%. Таким образом, биопрепарат Melobass, пс. характеризуется выраженным овицидным действием. Концентрация, вызывающая 50%-ную смертность *T. urticae* ($СК_{50}$) для подвижных стадий и для яиц составила 0,09 и 0,11% соответственно.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что препарат Melobass, пс. на основе гриба *Beauveria bassiana* Bals. 10-06 обладает высокой биологической активностью по отношению к обыкновенному паутиному клещу на всех стадиях развития и является перспективным в контроле численности фитофага.

МИКОЛОГИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ *AGARICUS BISPORUS* (J. E. LANGE) ІМВАСН

Волощук Н. М., Бондарь Т. И., Троицкий И. М.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Чабаны-Киев

В течение последнего десятилетия грибоводство в Украине развивается возрастающими темпами. При этом следует отметить, что второй по важности проблем после экономических, с которыми сталкиваются грибные производства, являются потери производства из-за развития болезней и вредителей. Они составляют в среднем от 10 до 30%, однако известны многочисленные случаи банкротства или перепрофилизации предпринимательской деятельности грибоводов из-за значительных потерь, понесенных в результате возрастания инфекционного фона на производстве сверх биологического или экономического порога вредоносности.

Одним из методов наблюдения за инфекционным фоном и в принятии своевременных и достаточных санитарно-гигиенических мер по его снижению может стать микологическая индикация качества не только компоста и покровной смеси, но и исследования состояния культивационных помещений.

Известно, что основным источником инфекции при выращивании *Agaricus bisporus* является компост и покровная смесь, которые изначально несут большое число диаспор конкурентных грибов. Последние частично развиваются в субстрате, что свидетельствует о нарушении в его составе и технологии приготовления; другие переходят из компоста на мицелий и плодовые тела шампиньона, вызывая болезни.

Камеры, или помещения для выращивания шампиньона двуспорового являются особыми экосистемами, которые значительно отличаются от природных по климатическим, физико-химическим свойствам субстратов, атмосферой и видовой структурой микроорганизмов.

По данным литературы, видовой состав микромицетов приземных слоев воздуха является аналогичным составу почвы. То есть при высоком уровне присутствия диаспор потенциально патогенных грибов в почве существует большая вероятность распространения их в приземных слоях воздуха. В процессе выращивания шампиньона двуспорового в культивационных камерах поддерживаются определенные климатические условия, однородность которых достигается применением вентиляции. Следовательно, конкурентные виды микроорганизмов, в частности, микромицеты, развиваясь в компосте и покровной смеси, присутствуют не только в присубстратном слое, но и в воздухе культивационной камеры.

Нами было исследовано присутствие микромицетов-конкурентов *Agaricus bisporus* в воздухе культивационных помещений на разных этапах его выращивания седиментационным методом Коха. В результате исследования было изолировано и идентифицировано 21 род микромицетов, среди которых по числу КОЕ в воздушной среде камер на протяжении всех этапов выращивания шампиньона доминировали грибы родов *Penicillium* Link и *Cladosporium* Link. Это объясняется температурой и влажностью благоприятной для их развития и высокой частотой встречаемости в субстрате. Также в воздухе культивационных камер присутствовали и другие виды конкурентных микромицетов шампиньона: *Chromelosporium* sp., *Cladobotryum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. и *Verticillium* sp. Для них была отмечена характерная динамика появления в воздухе. При этом, не смотря на интенсивное поражение плодовых тел шампиньона белой гнилью, её возбудитель *Hypomyces perniciosus* Magnus не высеивался из воздуха.

Бесспорно, свой «вклад» в накопление потенциально опасных грибов в воздухе культивационных помещений вносят их стены, пол, потолок, металлические конструкции стеллажей, поливная вода, а также поступление воздуха и пыли из внешней среды.

В результате исследования различных поверхностей камер нами было идентифицировано присутствие на них преимущественно грибов родов *Aspergillus* Micheli, *Penicillium*, *Trichoderma* Pers. : Fr. и *Sepedonium* Link,

которые входили в состав микобиоты покровной смеси. Из поливной воды были выделены представители родов *Penicillium* и *Trichoderma*.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность индикации присутствия конкурентных микромицетов *Agaricus bisporus* в воздухе культивационных помещений на разных этапах его культивирования.

ГРИБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗЕМЛЕДЕЛИЕ

Волощук Н. М., Червонный А. Е.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Боярка-Киев

Одна из главных проблем современного сельского хозяйства – разработка биологических основ высокоэффективных природоохраняющих ресурс сохраняющих агротехнологий. Задачей, которых было бы обеспечение расширенного возобновления плодородия почв и получения высоких, стабильных урожаев сельскохозяйственных культур. В связи с этим актуальной необходимостью является замена интенсивных агротехнологий экологически сбалансированными биологическими.

Известно существование нескольких методов, которые применяются в биологическом сельском хозяйстве разных государств, основанных на принципе – «кормления почвы», которая является источником жизни для растений и биологически активной среды. При этом несомненное преимущество имеют комплексные подходы в использовании мероприятий, направленных на применение дополнительных источников энергии и поддержания экологического равновесия процессов в природе, применении грибных биотехнологий.

Отходы лесного хозяйства, в частности, сосновая тырса, в этом аспекте также может играть роль дополнительного притока энергии и, при надлежащей системе использования биологических факторов, в значительной мере способны способствовать улучшению плодородия почв. Последняя формируется под действием сложного комплекса природных и антропогенных факторов, основная роль среди которых принадлежит биохимической деятельности микроорганизмов, в частности, микромицетов.

Использование компостов в качестве составной биологического земледелия является известным направлением сохранения энергии и обогащения почв органическим веществом.

При этом микромицеты, которые принимают активное участие в биодеградации различных лигнинцеллюлозных отходов в природе, могут быть использованы и для биотехнологических целей, например, в приготовлении компостов.

В результате проведенных нами исследований микобиоты тырсы и торфа, до начала использования при приготовлении компоста, было изолировано и идентифицировано 14 видов микромицетов, принадлежащих к 12 родам. Наибольшее количество грибов (8 видов, 57, 1% от общего числа выделенных) принадлежало к классу *Hyphomycetes*. Также в исследованных образцах тырсы и торфа были представлены микромицеты классов *Zygomycetes* (3 вида, 21, 4%), *Ascomycetes* (2, 14, 3%) и *Oomycetes* (1 вид, 7, 2%).

Наибольшее количество видов грибов (9) было изолировано из образцов торфа. Его микобиота представлена как почвенными микромицетами, которые активно принимают участие в разложении, прежде всего легкодоступных органических соединений, так и разрушителями целлюлозных субстратов. К первым относятся *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora* и *Zygorhynchus heterogamus*, к другим – *Thielavia terrestris*, *Gliocladium catenulatum*, *G. varians* и *Trichoderma koningii*.

Следует заметить, что микромицет *Thielavia terrestris* относится к термофильным видам, для которых характерно активное участие и использование в процессе компостирования или деградации лигнин-целлюлозных субстратов, в частности, отходов растительного происхождения.

Микобиота сосновой тырсы была представлена 5 видами, большинство из которых по литературным данным, присуще целлюлозным субстратам, таким как древесина: *Penicillium variabile*, *Cadophora fastigiata*, *Phaeoestalagmus cycloporus* и *Trichoderma viride*.

Среди выделенных видов грибов представители рода *Trichoderma* Pers. : Fr. являются наиболее известными разрушителями субстратов, которые содержат целлюлозу, а также компонентами биопрепаратов защиты растений. Комплекс их целлюлозолитических ферментов способен гидролизировать как нативную целлюлозу, так и её растворимые производные. Целлюлозолитические свойства характерны и для грибов рода *Penicillium* Link.

Таким образом, составляющие тырсово-торфяного компоста заселены микобиотой, в состав которой входят виды, характеризующиеся потенциальной способностью разрушать субстраты растительного происхождения и ускорять процесс компостирования.

ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ И БАКТЕРИЙ НА ОРГАНИЗОВАННУЮ НЕПАТОГЕННУЮ ДЕСТРУКЦИЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ

Воробьев Н. И., Свиридова О. В.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, Санкт-Петербург

В почве деструкция органических субстратов является традиционным и основным видом деятельности микромицетов и бактерий. Так как сложные органические молекулы микроорганизмам не удается разложить за один

шаг, то они выстраиваются в жестко регламентированную деструктивную сеть и разлагают эти молекулы за несколько шагов до низкомолекулярных фрагментов. Деструктивные сети микроорганизмов отличаются устойчивой и сбалансированной организацией микроорганизмов, как в плане распределения выполняемых каждой клеткой операций, так и в плане фиксации последовательности производимых ими рестрикций. Одновременно в сети формируется специализированный клон микроорганизмов, которые обеспечивают основные рабочие клетки питательными и энергетическими ресурсами. В результате, в деструктивной сети различные группы микроорганизмов оказываются под мощным давлением системной организации, и клетки самостоятельно не могут выйти из системы или изменить свой метаболизм. Вследствие этого наблюдается «захват» сетью микроорганизмов из внешней среды и перепрограммирование микромицетов и бактерий на заданную непатогенную деструктивную функцию (в соответствии с положением микроорганизмов в сети). В ряде случаев в деструктивной сети наблюдается необратимое перепрограммирование микроорганизмов на уровне их геномов. В результате, такие микроорганизмы даже могут потерять способность развиваться и функционировать вне сети. В деструктивных сетях обеспечивается более надежное и экономичное выживание всех микроорганизмов. Поэтому в деструктивных сетях существование микроорганизмов намного выгоднее, по сравнению с выживанием вне системы или в условиях агрессивных взаимоотношений с живыми организмами.

В деструктивных сетях соотношение между численностями микроорганизмов и количеством фрагментов исходного субстрата поддерживается с высокой степенью точности. Учитывая то, что на каждом шаге деструкции число образующихся фрагментов молекул растет, можно утверждать, что число клеток, осуществляющих единичные акты деструкции, будет также расти и в точности соответствовать числу фрагментов молекул. Это означает, что интенсивность потоков трансформации веществ в почве в первом приближении постоянна и может меняться только путем внедрения в деструктивные сети наиболее продуктивных и активных микроорганизмов.

Начальная компоновка деструктивной сети сопровождается настройкой на специфическую деятельность всех микроорганизмов сети, включая и взаимную настройку непосредственно взаимодействующих клеток. В естественных условиях вероятность оптимальной компоновки деструктивной сети чрезвычайно мала. Поэтому нами были проделаны исследования по созданию искусственных условий для постепенного выстраивания микроорганизмов в деструктивную сеть. Анализ полученных данных показал, что варьированием микробным составом и физико-химическими условиями можно в течение трех-четырех недель получить активно работающую деструктивную сеть микроорганизмов. В нашей работе обнаружено, что даже удается образовать трехкомпонентную деструктивную сеть, состоящую из микромицетной, целлюлозолитической и лигнолитической подсетей. Эксперименты в полевых условиях показывают, что инокуляция организованными в деструктивную сеть микроорганизмами растительных остатков с последующим внесением их в почву приводит к перепрограммированию большей части аборигенной микрофлоры на биогеоумификацию. В связи с этим, можно предположить, что предлагаемые действия должны способствовать улучшению экологической обстановки в почве и снижению уровня заболеваний растений и животных.

МУЛЬТИЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА BOLETALES МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Гродзинская А. А., Самчук А. И.

Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

Институт геохимии, минералогии и рудообразования НАН Украины, Киев

К порядку *Boletales* относится наибольшее количество известных дикорастущих съедобных видов грибов, традиционно входящих в рацион славянских народов. Присущее им высокое содержание белков, липидов, полисахаридов, биологически активных веществ определяет не только их питательную ценность, но и выраженные лекарственные свойства, ставшие объектом специальных исследований в последние годы. Способность высших грибов накапливать металлы, в том числе тяжелые, хорошо известна. В то же время, гамма-спектрометрическое исследование болетальных грибов в течение всего послечернобыльского периода показывает, что в большинстве своем они являются гипераккумуляторами радиоцезия (Grodzinskaya et al., 1995-2009). Поэтому изучение содержания металлов в плодовых телах представителей *Boletales* представляет особый интерес как с точки зрения уточнения их питательных, лекарственных свойств и безопасности употребления, так и оценки их роли в геохимических миграционных процессах. Методом масс-спектрометрии с индукционно связанной плазмой (ICP-MS анализатор *ELEMENT-2*, Германия) исследовали содержание 11 минеральных элементов в плодовых телах *Boletus edulis*, *B. luridus*, *Xerocomus badius*, *X. chrysenteron*, *Leccinum aurantiacum*, *L. scabrum*, *Suillus luteus*, произрастающих на территории Киевской, Житомирской и Черниговской областей Украины.

Исследование минерального состава болетальных грибов показало высокий уровень биоаккумуляции плодовыми телами грибов физиологически важных незаменимых для человека микроэлементов - Fe, Zn, Cu, Mn, Se и Mo. При этом, следует отметить, что все изученные виды являются коллективными сорбентами железа, меди, цинка, марганца и избирательными сорбентами молибдена и селена. Основанная на усредненных данных общая последовательность уровней содержания минеральных элементов в образцах изученных видов выглядит следующим образом: Zn>Fe>Cu>Mn>Se>Mo>Ag>Cd>Sr>Hg>As. Такие элементы, как Cd, Ag, Pb, As, Hg присутствовали в значительно меньших концентрациях, а Sr не был обнаружен в трех из исследованных образцов. Пло-

довые тела *B. edulis* и *B. luridus* содержали значительно больше Ag (от 6,0 до 23,9 мг/кг сух. веса, ср. - 14,0), чем другие исследованные виды. В среднем содержание серебра было в 26 раз больше, чем у видов р. *Xerocomus*.

Ранее было показано, что молибден содержится в малых количествах и не у всех видов грибов (Соломко и др., 1986). Поэтому концентрация его в плодовых телах исследованных видов (при достаточно высоком уровне варибельности – от 30,2 у *Leccinum aurantiacum* до 0,21 у *X. chrysenteron*, ср. – 8,1 мг/кг с. в.) может свидетельствовать о специфичности его накопления болетальными грибами. Полученные нами данные свидетельствуют о достаточно высоких уровнях накопления токсических элементов – кадмия (максимальные значения отмечены у *B. edulis* – до 6,1 и *X. chrysenteron* – 5,4 мг/кг с. в.) и ртути (максимальное значение у *B. luridus* – 0,65, среднее содержание в исследованных образцах – 0,19 мг/кг с. в.). Исходя из допустимой ВОЗ недельной дозы Cd – 0,3–0,4 мг, употребление в пищу 100 г сухих (около 1 кг свежих грибов) в течение недели достаточно безопасно с точки зрения содержания в них кадмия. Виды р. *Boletus*, хотя и содержали на порядок больше ртути, чем другие болетальные грибы, все же уступают представителям семейства *Agaricaceae* (Калаи, 2009).

В настоящее время особый интерес вызывает селен, который обладает выраженными противоопухолевыми и антиоксидатными свойствами и рассматривается как один из важнейших элементов в составе пищевых продуктов и создаваемых биологически активных добавках. В частности, разрабатываются грибные биотехнологии, направленные на получение мицелиальной биомассы культивируемых видов (главным образом, лигнотрофных), обогащенной селеном. Следует заметить, что Se относится к высокотоксичным элементам, поэтому при разработке подобных подходов очень важен расчет дозы. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что концентрация Se у *B. edulis* (в пределах от 17,9 до 32,5, ср. – 25,2 мг/кг с. в.) и *B. luridus* – 15,9 мг/кг с. в. существенно превышала не только содержание этого элемента в плодовых телах дикорастущих и культивируемых видов грибов, но и других болетальных видов. Таким образом, в результате проведенных исследований установлена видоспецифичность накопления Se, Ag и Hg, свойственная *B. edulis* и *B. luridus*. Можно предположить, что противоопухолевое действие *B. edulis*, используемое в народной медицине, определенным образом связано с высокими уровнями накопления селена в плодовых телах.

КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР МАКРО И МИКРОМИЦЕТОВ КАК БАЗА ДЛЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА И СОЗДАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Громовых Т. И.¹, Кузнецова Л. С.¹, Садыкова В. С.²

¹Московский государственный университет прикладной биотехнологии

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Коллекции культур микро- и макромицетов имеют особо важное теоретическое и прикладное значение как продуценты биологически активных веществ, пробиотиков и других препаратов. Они необходимы для подготовки специалистов в области биотехнологии, микробиологии, микологии, вирусологии, пищевой промышленности, фармакологии и сельского хозяйства. Успешное функционирование коллекции чистых культур грибов связано с изучением биологических и биотехнологических свойств штаммов и их таксономической принадлежности. Такая коллекция культур была создана в Московском государственном университете прикладной биотехнологии в целях развития научного и образовательного процессов и для сохранения биологического разнообразия.

Основной принцип поддержания коллекции – промышленная и экологическая значимость штаммов при формировании критериев их отбора в качестве продуцентов в биотехнологических процессах. Проведена работа по идентификации и изучению свойств штаммов с использованием методов изучения микро-, макро- морфологических, культуральных и генетических признаков культур. В коллекции культур мицелиальных грибов имеются штаммы – продуценты биологически активных веществ и штаммы инициирующие поражение поверхности мясных и молочных продуктов.

Проведена систематизация коллекции мицелиальных грибов и составлены паспорта штаммов грибов видов: *Aspergillus ochraceus*, *Bipolaris ellisii*, *Bipolaris nodulosa*, *Bipolaris zeae*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius*, *Laetiporus sulfureus*, *Piptoporus betulunus*, *Penicillium chryzogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Clonostachys rosea* f. *catenulate*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma citrinoviride*, *Ulocladium botrytis*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium verrucosum*, *brevicompactum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium candidum*, *Penicillium commune*.

МИКРОМИЦЕТЫ БУРЯТИИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Дарханова Т. А., Бибилова М. В., Грамматикова Н. Э.

МГУ имени М. В. Ломоносова, ГНЦ по антибиотикам, Москва.

Анализ способности культур микромицетов, выделенных из экологически чистых районов, продуцировать антибиотики представляет интерес как характеристика биоразнообразия данной выборки штаммов грибов, так и возможность отбора новых продуцентов БАВ. Наличие антимикробной активности опреде-

ляли в культуральной жидкости и в ацетоновом экстракте из мицелия 56 штаммов микромицетов, выделенных из почвы и смежных с ней субстратов Бурятии, в отношении 11 тест-микроорганизмов, включая клинические резистентные штаммы грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов. Антибиотическая активность была выявлена у 34 штаммов. В отношении *S. aureus* активность проявили 12 штаммов, из которых 2 штамма продуцировали антибиотики широкого спектра действия. Наибольший интерес представляют 5 штаммов, проявивших избирательность в отношении *S. aureus* ATCC 29213 и *S. aureus* ATCC43300 (MRSA). Отобраны также 3 штамма, избирательно ингибирующие грамотрицательные тест-культуры. В отношении грибной микрофлоры отобраны 11 штаммов, продуцирующие соединения с антиаспергильной активностью, и 4 штамма, ингибирующие рост *Candida albicans* CBS 8836 и *Candida krusei* 600M.

При оценке продукции биологически активных соединений грибами Бурятии нами также был проведен поиск ингибиторов сигнальной системы quorum-sensing (QS). Оценивали подавление образования пигмента виолацеина штаммом *Chromobacterium violaceum* CV026. Штамм CV026 (с инактивированным геном, отвечающим за синтез сигнальной молекулы QS-системы грамотрицательных бактерий, ацил-гомосеринлактона (AHL), способен образовывать виолацеин при внесении в среду культивирования химически-синтезированных AHL. Ингибиторную активность экстрактов оценивали по диаметру зон отсутствия пигментации вокруг лунок с экстрактами. Были отобраны 3 штамма, ацетоновые экстракты которых проявляли выраженный ингибиторный эффект: *Aspergillus ustus* №21, *Penicillium chermesinum* №26 *Arthrotrix oviformis* №44.

Отобранные ингибиторы системы QS были изучены на способность подавлять факторы вирулентности клинического изолята *P. aeruginosa* 71. Показана способность экстрактов ингибировать образование пигмента-антибиотика пиоцианина. Интересно, что экстракт штамма №21 ингибировал образование пиоцианина в высоких концентрациях (100-200 мкл/мл) и стимулировал в низких (12, 5-25 мкл/мл). Аналогичные зависимости описаны у ингибитора QS фуранона C-30.

Установлено, что отобранные экстракты в концентрации 25-100 мкг/мл ингибировали стафилолитическую активность, вызываемую супернатантом, полученным при росте в жидкой среде клинического штамма *P. aeruginosa* 71.

Таким образом, в результате исследования отобраны микромицеты, продуцирующие соединения, активные в отношении клинических изолятов бактериальных штаммов, клинически важных грибных штаммов, а также показана способность исследованных микромицетов к синтезу ингибиторов системы кворум сенсинга, включая факторы вирулентности клинического изолята *P. aeruginosa* 71.

ПОИСК АКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СРЕДИ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Древаль К. Г., Бойко М. И.

Донецкий национальный университет, Донецк

Лигноцеллюлозная биомасса является потенциальным источником дешевого сырья для получения разнообразных продуктов и топлива, в частности этанола (Скомаровский, Марков, Гусаков и др., 2006). В процессах биоконверсии целлюлозы этапом, который сдерживает внедрение технологии в производство, является ферментативный гидролиз целлюлозы до глюкозы. В связи с этим на сегодняшний день остро стоит вопрос поиска активных продуцентов ферментов комплекса целлюлаз среди различных грибов и микроорганизмов.

Учитывая это, а также ввиду малой изученности способности базидиальных грибов к синтезу целлюлозолитических ферментов, перед нами стояла задача скрининга высокопродуктивных штаммов среди грибов класса *Basidiomycetes*. Для этого была изучена способность к продукции целлюлаз у 37 различных культур, которые относятся к различным видам родов *Schizophyllum*, *Trichaptum*, *Irpex*, *Fomes*, *Coriolus* (= *Trametes*), *Pleurotus*, *Daedaleopsis*, *Lepista*, *Inonotus*, *Stereum*, *Heterobasidion*, *Auricularia*, *Chondrostereum* и *Phellinus*. Штаммы культивировались на питательной среде Чапека с добавлением фильтровальной бумаги (m=130 mg) в качестве единственного источника углерода. Активность целлюлаз в культуральном фильтрате штаммов определяли на 7 и 14 сутки культивирования (для сравнения результатов с литературными данными) общепринятыми методами (Ghose, 1987; Mullings, 1985; Синицин, Черноглазов, Гусаков, 1993). Активность целлюлаз КФ определяли по отношению к фильтровальной бумаге, целлобиозе, Na-карбоксиметилцеллюлозе (Na-КМЦ) и гидроксипропилцеллюлозе (ГЭЦ). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (ВС) из соответствующего субстрата за 1 мин для полисахаридных субстратов и 1 мкмоль глюкозы за 1 мин из целлобиозы. ВС определяли по методу Шомодьи-Нельсона (Синицин, Черноглазов, Гусаков, 1993). Содержание глюкозы определяли глюкозоксидазно-пероксидазным методом. Содержание белка в исследуемых пробах определяли спектрофотометрическим методом (Дарбре, 1989).

Установлено, что наибольшей целлюлазной активностью по отношению к фильтровальной бумаге (АФБ) обладали штаммы J-II-2, I-6, K-1, которые относятся к виду *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. Максимум АФБ для них определен на 14 сутки культивирования, абсолютное максимальное значение составило 4,80 ед. (содержание белка 0,51 мг/мл). По отношению к Na-КМЦ наивысшей целлюлозолитической активностью обладали штаммы Ap-G2 *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt., SC-8 *Schizophyllum commune* (Fr.) и II-10 *I. lacteus*. Абсолютный максимум активности ферментов по отношению к Na-КМЦ составлял 31,85 ед. (содержание белка 0,43 мг/мл). Наиболее активно ВС из ГЭЦ образовывали культуры J-II-2, I-9, I-6, которые относятся к виду *I. lacteus*. Абсолютный максимум ГЭЦ-активности составлял 17,22 ед. (содержание белка 2,30 мг/мл). Что касается активности КФ штаммов по отношению к целлобиозе, то наивысшими показателями обладали культуры SC-8-6 и SC-8, относящиеся к виду *S. commune*, и J-II-2 *I. lacteus*. Абсолютный максимум активности по целлобиозе составлял 84 ед. (содержание белка 0,18 мг/мл).

Таким образом, установлено, что исследованные штаммы дереворазрушающих базидиомицетов способны к активному синтезу ферментов целлюлозолитического действия. Полученные значения активности целлюлаз, содержащихся в культуральных фильтратах исследуемых штаммов, могут быть увеличены в несколько раз при оптимизации условий культивирования, что делает их перспективными объектами биотехнологии.

ОПИСАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

Дьяков М. Ю.¹, Камзолкина О. В.¹, Штаер О. В.¹, Бисько Н. А.², Поединок Н. Л.², Михайлова О. Б.², Тихонова О. В.³, Толстихина Т. Е.³, Васильева Б. Ф.³, Ефременкова О. В.³

¹Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

²Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

³Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

В последние десятилетия всё больше внимания уделяется изучению различных соединений из высших базидиальных грибов. Это обусловлено сравнительной простотой получения больших объёмов биомассы и сложностью грибного метаболизма, однако в настоящее время исследована лишь незначительная часть перспективных для использования видов. Одним из факторов, сдерживающих развитие такого рода работ, является недостаток знаний о биологии многих представителей этой гетерогенной группы.

Из природных источников нами был выделен в культуру 21 штамм, относящийся к 18 видам базидиомицетов различных таксономических групп. Основную часть культур составляли агариикоидные базидиомицеты (семейства Agaricaceae, Marasmiaceae, Mucenaceae, Paxillaceae, Polyporaceae, Strophariaceae, Tricholomataceae). Также в исследования включены культуры афиллофороидных (*Sparassis crispa*) и гастероидных базидиомицетов (*Lycoperdon perlatum* и *L. pyriforme*). Основное внимание было уделено ксилотрофным грибам, поскольку у многих представителей этой эколого-трофической группы выявлены биологически активные вещества, и именно эта группа рассматривается, как наиболее перспективная для поиска их продуцентов. Довольно широко представлены подстилочные сапротрофы. Кроме того, в работу были включены гумусовые сапротрофы (промышленно культивируемый *Coprinus comatus*). Для большего охвата разнообразия макромицетов в группу ксилотрофных грибов были включены паразитические виды (*Armillaria* sp.) и виды, развивающиеся на погребённой древесине (*Sparassis crispa*), а также микоризообразователь *Paxillus involutus*. Сбор плодовых тел макромицетов проводили с июня по октябрь 2006 и 2007 гг. в Москве и Московской области (окрестности Звенигородской биологической станции МГУ имени С. Н. Скадовского), в Ростовской области и в Краснодарском крае (окрестности г. Сочи). Чистые культуры получали тканевым методом. С помощью световой и электронной микроскопии были описаны морфологические свойства культур, подтверждающие их принадлежность к классу базидиомицетов и позволяющие их идентифицировать в монокультуре по ряду специфических микроморфологических черт. Только у двух штаммов (*C. nebularis* 3921, *R. maculate* 3938) не выявлено морфологических особенностей.

Способность 16 штаммов грибов к биосинтезу антибиотиков определяли путем одно- или двухстадийного культивирования на 7 питательных средах. Установлено, что при глубинном культивировании антимикробные вещества образуются у 13 штаммов (81,25%) 12 видов грибов (*Armillaria* sp., *Coprinus comatus*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus ulmarius*, *Lentinus tigrinus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Macrolepiota procera*, *Panellus serotinus*, *Pholiota aurivella*, *Pholiota lenta*, *Rhodocollybia maculate*, *Sparassis crispa*). Образующиеся антибиотики эффективны в отношении тест-штаммов бактерий, в том числе устойчивых к бета-лактамам (MRSA) и гликопептидным антибиотикам. Не обнаружено антибиотической активности в отношении грибных тест-культур (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259). Высокий процент выявления продуцентов антибиотиков при первичной скрининге характеризует базидиомицеты как перспективные объекты для изыскания новых антибиотиков.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-04-90428-Укр_ф_а. и ГФФИ - № Ф28/242 - 2009.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ФОСФОРА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ФОСФАТНЫХ РУД ПОД ДЕЙСТВИЕМ ШТАММА №16-GJS 03-35 *TRICHODERMA ASPERELLUM* - АНТАГОНИСТА ФИТОПАТОГЕНОВ.

Жиглецова С. К. ¹, Дунайцев И. А. ¹, Кондрашенко Т. Н. ¹, Ариповский А. В. ¹, Клыкова М. В. ¹, Старшов А. А. ¹, Коломбет Л. В. ²

1 – ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии ФС Роспотребнадзора, Оболенск

2 – НИЦ токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов ФМБА, Серпухов

Возможность использования микроорганизмов для разработки биофосфорных удобрений, в которых эффективное высвобождение фосфора из руд происходит непосредственно в полевых условиях и не наносит вреда окружающей среде, привлекает все больше внимание. Если в качестве микроорганизмов, растворяющих фосфатную руду, будут использованы штаммы-антагонисты фитопатогенов, например, грибы рода *Trichoderma*, наличие их в комбинированном препарате дополнительно обеспечит защиту растений от болезней.

В результате скрининга ранее был отобран штамм №16-GJS 03-35 *T. asperellum*, антагонист многих возбудителей болезней растений, обладающий способностью высвобождать фосфор из трикальций фосфата – модельного аналога минеральных фосфатных руд. Сочетание двух биологически и экономически важных свойств у отобранного гриба рода *Trichoderma* позволяет рассматривать его в качестве перспективного продуцента биопрепаратов комбинированного действия - пролонгированного фосфорного удобрения с фунгицидными свойствами. Однако известно, что фосфатные руды могут различаться по доступности для одного микроорганизма более чем в 5 раз, и под влиянием руды может изменяться механизм высвобождения фосфатов. Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение механизма высвобождения фосфора из различных типов фосфатных руд под воздействием штамма №16-GJS 03-35 *T. asperellum*, необходимое для последующей разработки комбинированного препарата на его основе.

Для изучения доступности фосфатных руд различного генезиса гриб культивировали в минимальной минеральной среде, где в качестве источника фосфора использовались фосфатные руды 9 отечественных и наиболее крупных зарубежных месторождений. Исследовались эндогенные и экзогенные апатиты, а также фосфориты - океанические, желваковые, ракушечниковые и остаточно-метасоматические. Для определения механизма растворения фосфатов из руд под воздействием гриба в процессе культивирования изучался состав метаболитов с помощью газовой хроматографии.

В результате проведенных исследований показано, что доступность фосфатных руд для *T. asperellum* зависит от происхождения руды и различается более чем в 100 раз. Наиболее доступными оказались океанические осадочные фосфориты. Из них в раствор переходило более 100 мг/л фосфора. Наименее доступными оказались экзогенные апатиты. Из них под воздействием *T. asperellum* фосфор в раствор не переходил. Эндогенные апатиты оказались несколько более доступными (16 мг/л), чем экзогенные.

При использовании всех рассмотренных типов руд растворение фосфатов под воздействием штамма №16-GJS 03-35 *T. asperellum* происходило при участии глюконовой и кетоглюконовой кислот, которые являлись продуктом прямого окисления глюкозы с помощью ферментных систем гриба. При этом основную роль в процессе растворения фосфатов играла структура руды, а не количество продуцируемых грибом кислот. Так, в присутствии экзогенных апатитов в культуральной жидкости образовывалось в 2, 5 раза больше кислот, чем в присутствии океанических фосфоритов.

Проведенные исследования позволяют предложить примерный качественный и количественный состав комплексного препарата на основе *T. asperellum* для решения задач продовольственной и экологической безопасности.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ШТАММА В-02 *IRPEX LACTEUS* FR.

Загнитко Ю. П.

Донецкий национальный университет, Донецк

Температура и ионная сила раствора – один из главнейших факторов, которые влияют на активность и стабильность молекулы белка, скорость ферментных реакций, сродство фермента к субстрату и др.

Большое количество и разнообразие ферментных реакций, где показано влияние температуры, доказывает важность этого физического фактора.

Было показано, что 0, 1 %-ный раствор ферментного препарата соответствует активности стандартного раствора фибринолизина. Для изучения влияния разных температур при разных режимах прогревания на активность ферментов тромболитического и молокосвертывающего действия использовали 0, 1 %-ный водный раствор белков, полученных при 80 %-ном насыщении культуральной жидкости штамма В-02 *I. lacteus* сернокислым аммонием. Для исследования влияния температурного режима на тромболитическую и молокосвертывающую активность 0, 1 %-ный раствор фермента прогревали на протяжении 60 мин. в термостатах при следующих температурах: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60°C, после чего определяли соответствующую для каждого препара-

та активность. С целью стабилизации белковых молекул на 0,1 %-ный раствор ферментов действовали высокими температурами: 45, 50, 55, 60, 65 и 70°C на протяжении 15 мин., после чего его быстро охлаждали до 15°C и определяли тромболитическую и молокосвертывающую активность согласно методикам [Имшенецкий, Брочкая, 1969; Каваи, Мукаи, 1970].

Изучение термостабильности ферментных препаратов штамма B-02 *Irpex lacteus* показало, что при прогревании раствора белка на протяжении 60 мин. максимальный уровень тромболитической и молокосвертывающей активности был при температуре 30°C (230 у. е. и 591866, 5 ед / мг соответственно). При температурах 25, 35 и 40°C также отмечены довольно высокие показатели тромболитической и молокосвертывающей активности, но достоверно ниже, чем при температуре 30°C, а в интервале температур 45-60°C наблюдали достоверное снижение уровня активности тромболитических и молокосвертывающих ферментов.

Прогревание 0,1 %-ного раствора ферментных препаратов тромболитического и молокосвертывающего действия на протяжении 15 мин. показало стабилизирующее действие кратковременного прогревания при высоких температурах на уровень активности ферментов тромболитического и молокосвертывающего действия. Так, в интервале температур 45-60°C можно было отметить достоверно более высокие показатели тромболитической и молокосвертывающей активности, чем при тех же самых температурах при прогревании на протяжении 60 мин. При температуре 65°C отмечен слабый уровень активности исследуемых ферментов, а температура 70°C вызывала полную инактивацию ферментов тромболитического и молокосвертывающего действия.

Полученные экспериментальные данные показывают, что полученные ферментные препараты направленного действия из культуральной жидкости штамма B-02 *Irpex lacteus* Fr. термически нестабильны, но кратковременное прогревание (15 мин.) при высоких температурах не вызывает инактивацию белковых молекул ферментов тромболитического и молокосвертывающего действия.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОБАВКИ КОРМОВОЙ НА ОСНОВЕ ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS* В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

Зинина Н. В.¹, Буйко Н. В.¹, Щерба В. В.²

1 Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского,

2 Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Содержание птицы в промышленном птицеводстве предполагает большую физиологическую нагрузку на организм различных стресс-факторов (высокая скученность, гиподинамия, вакцинации, использование специфических рационов с повышенным содержанием протеинов и жиров, недостатком витаминов и аминокислот), влияние патогенной микрофлоры и других неблагоприятных условий среды. Одним из путей решения указанных проблем является создание принципиально новых физиологически функциональных препаратов иммуностимулирующего и антиоксидантного действия.

В этом отношении перспективно использование каротиноидов как веществ, выполняющих в организме целый ряд специфических и жизненно важных функций. Каротиноиды выполняют более 20 биологических функций – от фоторецепции до защиты организма от перекисного окисления липидов. У птицы бета-каротин вместе с витаминами А, Е и С является составной частью эффективного антиоксидантного комплекса. Особый интерес представляют продуценты липофильных биоантиоксидантов. Среди лекарственных грибов одним из наиболее перспективных является базидиальный гриб *Laetiporus sulphureus* – продуцент каротиноидов. Данный гриб может найти широкое применение для получения препаратов, обладающих антиоксидантной защитой.

Целью данных исследований явилось определение эффективности использования добавки кормовой на основе липокаротиноидного комплекса гриба *L. sulphureus* в промышленном птицеводстве.

Материалы и методы исследований. На базе РУСПП «Смолевичская бройлерная птицефабрика» были проведены производственные испытания добавки кормовой на основе гриба *L. sulphureus* при выращивании цыплят-бройлеров кросса «Флекс 400». Базой для сравнения служили показатели продуктивности бройлеров, содержащихся по стандартной технологии. При новом варианте содержания цыплят-бройлеры получали с комбикормом добавку из расчета 1,4 кг на 1 т комбикорма, начиная с 5-7 дневного возраста в течение 10-ти дней. На 15-й день опыта и в конце опыта в сыворотке крови определяли содержание общего белка, мочевины, общего кальция, неорганического фосфора, активность трансаминаз, щелочной фосфатазы – с помощью наборов фирмы «Кормей-Диана», содержание каротина в сыворотке и в ткани печени – по Бессею, в модификации Анисовой, показатель интенсивности перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид (МДА)) определяли в сыворотке и в тканях печени и мозга по методике И. Д. Стальной, Т. Г. Таршвили.

Результаты исследования. Применение добавки кормовой нормализует обменные процессы в организме цыплят. Концентрация каротина в сыворотке крови цыплят опытной группы превышала данные контрольной группы на 15-й день опыта на 106,6%, в конце опыта на 60,9%. Содержание каротина в печени в опытной группе превышало количество контрольной группы на 15-й день опыта на 52,9%, в конце опыта на 5,1%. Добавка обладает антиоксидантным действием, достоверно снижая уровень МДА в сыворотке и тканях печени и мозга. После применения добавки кормовой сохранность поголовья увеличилась на 0,9%, среднесуточный привес – на 1,7 г.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ШТАММА ГРИБА LS 1-06 *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL. FR) BOND. ET. SING

Иванова И. Е.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Москва

В настоящее время исследованиями доказано, что базидиальные грибы содержат в своем составе ряд биологически активных компонентов и являются источником полноценного белка. Один из них - *Laetiporus sulphureus* или серно – желтый трутовик. На основании того, что он имеет белок с высокой биологической ценностью, содержит большое количество каротиноидов, ненасыщенных жирных кислот, а также обладает антивирусным и антимикробным действием, представляет практический интерес поиска наиболее продуктивных и биологически активных штаммов, а также подбор оптимальной среды для их культивирования.

Исследования проводили со штаммом Ls1- 06 *Laetiporus sulphureus*, выделенным из плодового тела, собранного в республике Тыва. Для изучения особенностей штамма *Laetiporus sulphureus* подбирали оптимальную агаризованную среду для его выращивания. Данный штамм культивировали на следующих средах: капустный агар, крахмало – аммиачный агар, дрожжевой агар, сусло–агар, среда Сабуро. Оценка динамики прироста мицелия на питательных средах показала, что наиболее активно штамм рос на капустном агаре. Ростовый коэффициент на 12 сутки культивирования составил на данной среде 116, что значительно выше, чем на других средах. Неприемлемой для роста штамма *Laetiporus sulphureus* средой является крахмало – аммиачная, ростовой коэффициент на которой составил только 0, 6.

Оценку продуктивности биомассы штамма *Laetiporus Sulphureus* Ls1-06 на питательных средах при жидкофазном поверхностном культивировании проводили с использованием капустной питательной среды, которая была лучшей по ростовым характеристикам изучаемого штамма. Для оптимизации среды капустный агар обогащали следующими компонентами: листовничные опилки, молочная сыворотка и соевая мука «сопролекс». Для этого в стандартную капустную среду перед стерилизацией добавлялись эти составляющие в количестве 1%.

Учет показателей продуктивности проводили, начиная с 14 суток культивирования и заканчивая периодом, когда гриб достигал стационарной фазы роста. Культивирование проводили при 28 °C.

Исследования показали, что *L. Sulphureus* достигает стационарной фазы роста через 30 сут культивирования. Показатели накопления биомассы были минимальны на капустной среде с листовничными опилками – 3, 0 г/л.

Лучший показатель накопления биомассы наблюдается на капустной среде с молочной сывороткой – 4, 86 г/л. Высокое накопление биомассы на данной среде по сравнению с другими связано с большей плотностью мицелия.

Исследования антимикробной активности культуральной жидкости штамма проводили на тест-штаммах условно-патогенных бактерий. Установлено, что продукты метаболизма изученного штамма гриба *L. Sulphureus* оказывают антимикробное действие в отношении изученных тест – культуры. Однако степень чувствительности была неодинаковой. Так, наиболее чувствительными были *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*. Зоны угнетения роста тест-штаммов составляли от 12 до 17 мм в диаметре.

Таким образом, по проведенным исследованиям можно отметить, что капустный агар является более благоприятной средой для роста нового штамма *L. sulphureus*. Добавление в среду молочной сыворотки увеличивает продуктивность штамма, что позволяет получать больший выход биомассы. Продукты метаболизма штамма обладают антимикробной активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИСТАТИНА ПРИ СКРИНИНГЕ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ, СПОСОБНЫХ К ИНТЕНСИВНОМУ СИНТЕЗУ СТЕРИНОВ

Ильина Г. В., Гарибова Л. В.

Пензенская ГСХА, Пенза, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Использование базидиомицетов в качестве продуцентов биологически активных веществ, в том числе липоидной природы, получило в настоящее время широкое распространение в биотехнологии. В этой связи, перспективны исследования, посвященные отбору штаммов с повышенной способностью к синтезу ценных метаболитов. Многочисленные зарубежные и отечественные источники свидетельствуют о синтезе таким признанным продуцентом БАВ, как *Ganoderma lucidum* тритерпенов (ганодеровые кислоты), обладающих антиаллергическим и гиполипидемическим действием (Smith et al., 2002). Для самих грибов подобные вещества могут играть роль регуляторов процессов жизнедеятельности, в том числе для перехода к вторичному метаболизму, плодоношению и т. п. Химическая природа тритерпенов обладает значительным сходством с таким классом веществ как стероиды. Последние можно рассматривать как частично деградированные тритерпены, утратившие несколько углеродных атомов. Таким образом, процессы метаболизма этих веществ, несомненно, пересекаются, что позволяет предполагать наличие у тритерпенов роли своеобразного резерва для синтеза стероидов, в том числе эргостерина. Названный стерин является наиболее распространенным у грибов и входит в состав клеточных мембран. Эти компоненты мембран являются своеобразной биохимической мишенью для действия полиеновых макролидов, в том числе и нистатина. Для восстановления структуры мембраны требуется активизация синтеза эргостерина. В связи с этим, представ-

ляется логичной возможность развития в присутствии нистатина тех видов или штаммов, которые индивидуально характеризуются более интенсивным метаболизмом стероидов.

При реализации интенсивной технологии культивирования нами получены несколько экземпляров плодовых тел *G. lucidum*. Базидиоспоры гриба были собраны в асептических условиях, после чего с ними проводили исследовательские работы: изучение микроморфологии, инокуляция спор, а также спорового порошка в высокой степени разведения физиологическим раствором на питательные среды. Были получены монокариотические и дикариотические штаммы *G. lucidum*. Объектами исследований, которые легли в основу настоящей работы, стали четыре дикариотических штамма спорового происхождения, полученные на средах, содержащих полиеновый макролид нистатин.

На питательные среды (сусло-агар), содержащие 120 ЕД/мл нистатина, металлическим шпателем помещали споровый порошок и наблюдали прорастание базидиоспор и рост мицелия. Прорастание спор было отмечено только в 10% инокулированных чашек, тогда как в контроле (среда без нистатина), это значение составило 100%. Мицелий, развивающийся на среде с нистатином, характеризовался высокой плотностью, ярко-белой окраской и крайне медленными, хотя и отличными друг от друга у разных штаммов, темпами роста. В одном случае, после освоения мицелием трети питательной среды, было отмечено формирование мицелиального валика по периметру колонии, затем темпы роста мицелия заметно возросли, и оставшийся субстрат был освоен вдвое быстрее, чем первая его треть. Это можно объяснить активацией адаптационных биохимических механизмов, позволяющих противостоять воздействию высоких доз нистатина. Содержание эргостерина в мицелии определяли газохроматографическим методом с дериватизацией в триметилсилильные производные. В качестве стандарта использовали препарат эргостерина фирмы «Merck». Результаты исследований показали, что содержание определяемого вещества в мицелии устойчивых к воздействию нистатина штаммов достоверно превышает контрольные показатели в 1, 3 – 1, 5 раза. В ходе дальнейших исследований предполагается определение динамики содержания эргостерина в мицелии на разных стадиях развития последнего в присутствии нистатина.

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОТЕАЗ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ У ХИЩНЫХ НЕМАТОФАГОВЫХ ГРИБОВ

Касумова С. Ю., Намазов Н. Р., Мурадов П. З., Агабекова Р. А., Бабаева Ш. А.
Институт Микробиологии НАН Азербайджана, Баку
Бакинский Государственный Университет, Баку

Фибринолитические ферменты, продуцируемые микроорганизмами, в настоящее время вызывают большой интерес. Как известно, протеолитические ферменты с фибринолитическими свойствами, способны образовывать многие микроорганизмы. Обнаружение у протеаз микробного происхождения способности к лизису фибрина и внутрисосудистых тромбов открывает новые возможности применения их в медицине. В связи с чем, поиск и изучение продуцентов ферментов, обладающих фибринолитическими свойствами, имеет практическое значение.

Цель данной работы - изучение способности хищных нематофаговых грибов к биосинтезу протеаз с фибринолитическим действием. Объектами исследования являлись 110 штаммов хищных грибов из родов *Arthrobotrys*, *Nematophagus*, *Candelabrella*, *Golovinia*, *Dactylella*, *Dactylariopsis*, *Dactylaria*. Грибы культивировались при $t = 28-30^{\circ}\text{C}$ на питательной среде следующего состава (%): сахароза – 3, кукурузный экстракт – 1, молочная кислота – 0,15, глицерин – 1, KCl – 0,05, MgSO_4 – 0,05, K_2HPO_4 – 0,1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,025, вода дистиллированная. Культивирование проводили в стационарных условиях в колбах с 50 мл среды в течении 11 суток. Фибринолитическую активность определяли методом фибриновых пластинок. Фибриновые пластинки с испытуемыми образцами, выдерживали 24 часа при 37°C . Тромболитическую активность, оценивали по скорости лизиса искусственно полученных тромбов крови и плазмы человека. За лизисом тромбов наблюдали в течении 24 часов.

Как показали результаты экспериментов, нематофаговые гифомицеты способны активно разжижать фибриновые пластины. Наиболее интересные данные получены у представителей рода *Arthrobotrys*. Фибринолитическая активность проявляется во все времена культивирования грибов и выявлено два пика активности. Первый максимум ферментативной активности культурального фильтрата приходится на 3-5 сутки роста, затем, после некоторого снижения вновь поднимается на 9-11 сутки. Для выяснения того, как влияют ионы водорода на рост и ферментативную активность исследуемых культур, среды составлялись с различными исходными значениями pH (от 4 до 9). Проверенные нами штаммы, оказались мало чувствительными к колебаниям pH среды и в вышеуказанных пределах, наблюдалось обычное развитие мицелия и прорастание спор. Однако, хороший рост мицелия отмечался в пределах от 5, 2 до 8, 0. Что касается влияния pH среды на ферментативную активность, то, как показали результаты исследований, наиболее оптимальным значением pH оказались среды с исходным значением близким к нейтральному (6, 8-7, 2). Способность микроорганизмов образовывать протеазы с фибринолитическим действием не всегда коррелирует с их тромболитической активностью и поэтому нередко культуральная жидкость, вызывающая растворение фибриновой пленки, не лизирует тромбы крови. Кроме того, при использовании препаратов в качестве фибринолитических агентов, особое внимание уделяется тщательной проверке способности их вызывать гемолиз. Культуральная жидкость исследуемых видов лизировала тромбы крови человека за 18-38 часов. Наибольшая тромболитическая активность выявлена у двух видов рода *Arthrobotrys*: *A. longa* и *A. conrasta*, которые были отобраны для дальнейших исследований, как виды, обладающие высокой фибринолитической и тромболитической активностью.

Исследуемые грибы не обладали гемолитическими свойствами, что также является необходимым условием для тромболитического агента.

АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ *CORIOLOUS QUEL* (*TRAMETES FR.*) НА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДА И АЗОТА

Клечак И. Р., Антоненко Л. А., Крысюк Ю. С.

Национальный технический университет Украины «КПИ», Киев

Грибы белой гнили, к которым относится и род *Coriolus Quel* (*Trametes Fr.*), зарекомендовали себя как активные продуценты целлюлолитических, окислительных и других ферментов, благодаря которым, они успешно разрушают лигноцеллюлозный материал в природе. Существует достаточное количество работ, направленных на исследование окислительных (Королева, 2000; Гаврилова, 2002; Горшина, 2006; Никитина, 2006; Русинова, 2007; Cherkashin, 2007) и целлюлолитических ферментов грибов *Coriolus*. Целью наших опытов было исследование активности этих ферментов у штаммов грибов рода *Coriolus* из Коллекции культур шляпочных грибов отдела микологии Института ботаники имени Н. Г. Холодного НАНУ, для которых эти исследования ранее не проводились.

В опыте была определена активность внеклеточных монофенол-монооксигеназы и эндо-1, 4-β-глюканазы 4 штаммов разных видов (*C. versicolor*, *C. hirsutus*, *C. zonatus*, *C. villosus*) на различных источниках углеродного и азотного питания. В качестве источников углерода использовали 12 веществ: глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, фруктозу, ксилозу, арабинозу, инозит, сорбит, маннит, крахмал; а источников азота - 8 веществ: хлорид аммония, нитрат аммония, сульфат аммония, дигидрофосфат аммония, нитрат натрия, пептон, триптофан, метионин. Культивирование проводилось в стационарных условиях в течение 7 суток при температуре 30 °С.

При исследовании активности монофенол-монооксигеназы при культивировании на средах с различными источниками углерода и азота оказалось, что штаммовые особенности играют более важную роль, чем предложенные источники питания. Так, активность монофенол-монооксигеназы у штамма 353 *C. versicolor* отсутствовала на всех источниках углерода и азота, кроме NH_4Cl , а для 5137 *C. hirsutus* - отсутствовала на всех источниках азотного питания, кроме пептона. Эта информация подтверждает необходимость внесения в состав среды индуктора окислительных ферментов.

Наибольшие значения монофенол-монооксигеназы были отмечены для штамма 1009 *C. villosus* на среде с крахмалом в качестве источника углерода (102, 5 ед/см³, что в 2 раза больше, чем на среде с глюкозой и в 5 раз более, чем в отсутствии источника углерода). На образование ферментов в этом случае также указывает высокое, по сравнению с другими источниками углерода, содержание внеклеточного белка (37, 7 мг/дм³) в культуральной жидкости, часть из которого является ферментативным. Также высокая активность монофенол-монооксигеназы на среде с крахмалом совпадала с наибольшим накоплением биомассы 1, 54 г/дм³ для штамма 1009.

Что касается активности эндо-1, 4-β-глюканазы, то высокие ее значения отмечены для 353 *C. versicolor* на фруктозе и манните, для 5302 *C. zonatus* на крахмале и мальтозе, для 5137 *C. hirsutus* на лактозе и манните, для 1009 *C. villosus* на манните, крахмале и мальтозе.

Таким образом, изменяя источники углеродного и азотного питания, было отобрано штамм с наибольшей активностью монофенол-монооксигеназы 1009 *C. villosus* и варианты сред: с крахмалом и пептоном, с глюкозой и пептоном. Исходя из высокой активности эндо-1, 4-β-глюканазы были отобраны для дальнейших исследований штаммы 353 *C. versicolor* и 1009 *C. villosus*.

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИЯ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Кожемякина Н. В., Ананьева Е. П., Гурина С. В.

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Мицелий базидиальных грибов *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Flammulina velutipes* (Curtis: Fr.) P. Karst., *Fomes fomentarius* (L.:Fr.) Fr. был получен в результате глубинного культивирования на глюкозо-пептонной среде. Углеводные фракции были выделены из глубинного мицелия путем водной экстракции. Растворимые фракции (РФр) представляли собой смесь гетерополисахаридов, состоящих преимущественно из глюкозных, а также маннозных и галактозных остатков, нерастворимые (НФр) - хитин-глюкановый комплекс.

Биологическую активность мицелия грибов и фракций, оценивали по их влиянию на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), а именно на изменение показателей, отражающих стадии фагоцитоза: хемотаксис, распластывание на стекле, микробоцидность по отношению к *Staphylococcus aureus* и поглонительную способность по отношению к *Candida albicans*.

Мицелий грибов при пероральном введении в течение 10 дней оказывал стимулирующее действие на показатели функциональной активности макрофагов. В результате кормления мышей мицелием наблюдали повышение показателей функциональной активности макрофагов: количество перитонеальных клеток достоверно увеличилось в 1, 6-1, 7 раза, распластанных клеток - в 1, 4-1, 7 раза по сравнению с контрольным уровнем, поглонительная способность мононуклеарных фагоцитов в отношении *C. albicans* увеличилась в 1, 5 раза по сравнению с контролем. Углеводные фракции оказывали более выраженное действие на макрофаги по сравнению с мицелием. Фракции достоверно стимулировали функциональную активность макрофагов в течение всего срока наблюдения (10 дней) после однократного внутрибрюшинного введения, что свидетельствовало об их стой-

ком и долговременном действии. Наиболее эффективны были растворимые фракции мицелия, при их введении показатели хемотаксиса и активации цитоплазматической мембраны макрофагов (распластывания) достигали максимальных значений на 5-е сутки эксперимента: количество перитонеальных клеток в брюшной полости увеличивалось в 2, 9–3, 4 раза, количество распластанных макрофагов – на 41–58% по сравнению с контрольным уровнем. К 10-м суткам показатели несколько снижались, сохраняясь достоверно выше контроля. Нерастворимые фракции оказывали менее выраженное стимулирующее действие на макрофаги, чем растворимые, но обладали пролонгированным эффектом, который сохранялся вплоть до 10-х суток эксперимента, что, возможно, связано с медленным выведением фракций из организма. Поглощение макрофагами клеток *C. albicans* на ранние сроки действия гликанов было на уровне контроля вероятно в связи с временным экранированием лектиноподобных рецепторов на поверхности макрофагов и их недоступностью для маннозосодержащих полисахаридных компонентов клеточных стенок дрожжей. На 5-е сутки эксперимента наблюдали усиление фагоцитарной активности макрофагов под действием гликанов, особенно растворимых фракций (значение показателя увеличилось в 1, 4–2, 5 раза по сравнению с контролем), к 10-м суткам показатели фагоцитоза оставались на том же уровне. Фракции *G. applanatum*, *F. fomentarius*, *F. velutipes* стимулировали способность фагоцитов к киллингу тест-культуры *S. aureus*, наиболее сильным микробицидным действием обладала РФр *G. applanatum*.

Таким образом, показано, что мицелий исследуемых грибов и выделенные из него углеводные фракции являются активными стимуляторами основных функций клеток системы мононуклеарных фагоцитов и представляют несомненный интерес для разработки на их основе иммуностимулирующих препаратов.

СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ГРИБАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Костеневич А. А., Тамкович И. О., Сапунова Л. И.
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Среди практически значимых ферментов особое место занимает бета-галактозидаза (лактаза, β -галактозид-галактогидралаза, КФ 3. 2. 1. 23) – фермент класса гидролаз, катализирующий расщепление бета-галактозидов, в том числе лактозы. Фермент востребован для производства глюкозо-галактозного сиропа, вареных сгущенных и сухих молочных продуктов, концентратов молочной сыворотки, питьевого молока и кисломолочных продуктов с пониженным содержанием лактозы для детского и диетического питания, а также для кормления животных. Для создания современных рентабельных технологий получения ферментных препаратов указанного назначения необходимы высокоактивные штаммы-продуценты.

Ранее нами был проведен двухступенчатый скрининг бета-галактозидазной активности 170 культур грибов pp. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Culvularia*, *Fusarium* и *Penicillium*, хранящихся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и коллекции мицелиальных грибов лаборатории ферментов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» (Костеневич с соавт., 2007). На основании полученных результатов для дальнейших исследований были отобраны следующие наиболее активные в отношении синтеза бета-галактозидазы культуры: *Aspergillus nutans* F-65, *Penicillium chrysogenum* F-99, *P. crustosum* F-158, *P. variable* 12200, *P. canescens* 95/8, *P. jensenii* (Тамкович с соавт., 2008; Сапунова с соавт., 2009).

В настоящей работе исследованы особенности биосинтеза бета-галактозидазы указанными культурами грибов с целью выбора среди них наиболее технологичного штамма-продуцента. Для этого оценивали эффективность продукции вне- и внутриклеточного фермента грибами, которые выращивали глубинно в средах с лактозой или молочной сывороткой и различными источниками минерального азота, обеспечивающими как подкисление, так и подщелачивание питательной среды, в зависимости от особенностей метаболизма микроорганизмов.

Согласно полученным данным, все исследуемые мицелиальные грибы одинаково хорошо утилизировали лактозу в качестве единственного источника углерода, в том числе и в составе молочной сыворотки, и активно при этом синтезировали внеклеточные бета-галактозидазы с оптимумом действия преимущественно в кислой среде.

Установлено, что тип утилизируемого источника азотного питания практически не влиял на максимальный уровень накопления бета-галактозидазы в культуральной жидкости *P. jensenii*, *P. variable* 12200 и *P. crustosum* F-158. Образование фермента грибами *P. chrysogenum* F-99 и *P. canescens* 95/8 также мало зависело от источника азота, однако при наличии в питательной среде его аммонийной формы было в 1, 2–2, 0 раза более высокимени В то же время использование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в составе среды для культивирования *Aspergillus nutans* F-65 в качестве физиологически кислого компонента сопровождалось существенным повышением синтеза внеклеточного ферментного белка.

Результаты изучения динамики синтеза бета-галактозидазы исследуемыми мицелиальными грибами свидетельствовали о том, что максимальный уровень накопления фермента наблюдался у *P. canescens* 95/8 на шестые, а у *P. jensenii* и *P. chrysogenum* F-99 – на пятые сутки их культивирования в среде, содержащей в качестве источников углерода и азота соответственно молочную сыворотку и аммоний серноокислый.

Принимая во внимание полученные экспериментальные данные, в качестве потенциальных продуцентов внеклеточных бета-галактозидаз, преимущественно гидролизующих специфический субстрат в кислой среде и перспективных для гидролиза лактозы молочной сыворотки, отобраны *P. jensenii* и *P. chrysogenum* F-99.

СТРАТЕГИЯ ПОИСКА ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕИНАЗ АНТИКОАГУЛЯНТНОГО И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

**Кураков А. В., Крейер В. Г., Осмоловский А. А., Баранова Н. А., Егоров Н. С.
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва**

Многие мицелиальные грибы способны продуцировать протеолитические ферменты, способные оказывать воздействие на белки плазмы крови: проявлять фибринолитические, коагулазные и антикоагулянтные свойства. Способность к лизису фибрина заключается как в прямом воздействии на данный белок (собственно фибринолитическая активность), так и в активации пламиногена и превращения его в плазмин – протеиназу, лизирующую фибриновые сгустки (профибринолитическая активность).

Хорошо известны протеолитические препараты фибринолитического действия из *Aspergillus oryzae* («Аспергиллин О» «СА-7») и *A. terricola* («Террилитин»), успешно применявшиеся в клинической практике. В настоящее время перспективными представляются препарат фибринолитического действия «Трихотецин» (из *Trichotecium roseum*) и комплексный препарат фибринолитического и профибринолитического действия «Лонголитин» (из *Arthrobotrys longa*).

Весьма активными в отношении белков плазмы крови являются внеклеточные протеиназы различных видов аспергиллов, в частности *Aspergillus ochraceus*. Эти микромицеты представляют значительный интерес, т. к. способны образовывать ферменты не только фибринолитического и профибринолитического, но и антикоагулянтного действия, связанного с активацией протеина С – предшественника ключевой протеиназы системы гемостаза, ответственной за регуляцию свертывания крови и контроль чрезмерного тромбообразования.

Для изучения протеолитического комплекса *A. ochraceus* в отношении фибрина, пламиногена и протеина С были получены культуры, выделенные из образцов верхних горизонтов почв и растительных остатков, отобранных в южных регионах. Аспергиллы широко распространены в почвах различных экосистемах, и многие из них характеризуются термотолерантностью. В связи с этим для их изоляции были использованы образцы верхних горизонтов почв и остатков растений из южных регионов: пустынных песчаных почв, сероземов, солончаков, карбонатных черноземов, аллювиально-луговых почв, красно-коричневых почв, отобранных, соответственно, в степной (Воронежская обл., Краснодарский край), пустынной и полупустынной (Туркмения) и субтропических и тропических зонах (юг Крыма, Греция, Мексика). Для создания условий преимущественного роста термотолерантных видов их выделение проводили с применением 2-х стадийной инкубации посевов почвенного мелкозема и фрагментов растительных остатков на агаровые среды с целлюлозой (среда Гетчинсона) и сусло-агар с повышенной дозой ингибитора роста бактерий (сульфата стрептомицина) при температуре 39-54 °С в течение нескольких часов-суток. Затем, в случае отсутствия роста грибов чашки Петри с посевами выдерживали при 20-25 °С. В дальнейшем среди выросших колоний грибов проводили отбор изолятов *Aspergillus ochraceus*. Проверка активности протеиназ у изолятов *A. ochraceus* показала, что общей протеолитической, фибринолитической и антикоагулянтной активностями обладали все выделенные штаммы. Продуцентов активаторов пламиногена среди них выявлено не было. Значения названных активностей варьировали в зависимости от штамма.

Максимальной фибринолитической активностью обладал штамм, выделенный из аллювиально-луговой почвы Мексики, а антикоагулянтной способностью – изолят из карбонатного чернозема Воронежской области.

МИКРОМИЦЕТЫ – ПРОДУЦЕНТЫ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА

Кучмеровская Т. М., Донченко Г. В. Курченко И. Н., Супрун С. М.

Институт биохимии имени А. В. Палладина НАНУ, Киев

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

Биологически активные производные витамина B₃, никотинамидные динуклеотиды, играют важную роль в многочисленных метаболических процессах протекающих в живых организмах. В микробных клетках существуют строгие биохимические механизмы регуляции обеспечивающие постоянство внутриклеточных уровней коферментов. Ряд микроорганизмов вследствие нарушения этих механизмов приобретают способность к сверх синтезу коферментов, что может использоваться для биотехнологий их производства. Поэтому микромицеты могут быть перспективными продуцентами получения витаминов и коферментов. Так на основе *Blakeslea trispora* получен в-каротин. Известно, что микробиологический синтез витаминов и коферментов является реальной альтернативой химическому синтезу. Целью данной работы было проведение скрининга штаммов продуцентов коферментов, в частности NAD⁺, для пополнения банка продуцентов NAD⁺ и изучение его биосинтеза. Был отобран штамм с повышенным биосинтезом NAD⁺ - *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011. Изучены пути биосинтеза динуклеотида, активность никотинатмононуклеотид-пирофосфорилазы в клетках этого штамма. В работе использованы современные методы анализа. В начале стационарной фазы роста культуры вносили

меченные предшественники синтеза NAD^+ [^3H]триптофан и- [^3H] никотиновую кислоту. В кислоторастворимом бесклеточном экстракте гриба обнаружен почти весь спектр меченных пиридиновых нуклеотидов, что свидетельствует об интенсификации как триптофанового так и других путей биосинтеза NAD^+ . При инкубации с [^3H]триптофаном и с меченым ниацином было обнаружено, что максимум синтеза NAD^+ наблюдался через 6 часов культивирования, что указывает на активацию этих нативных путей биосинтеза динуклеотида. При внесении в среду культивирования 10^{-5} М аденозина в присутствии экзогенных предшественников кофермента наблюдали значительное увеличение пула NAD^+ . В то же время в бесклеточном экстракте *Fusarium sambucinum*, растущего в среде с ниацином и триптофаном активность никотинатмононуклеотид-пирофосфорилазы подавлялась. Однако в присутствии 10^{-3} М аденозина и предшественников биосинтеза NAD^+ в бесклеточной среде активность фермента увеличивалась практически в два раза. Более того, при отсутствии в среде триптофана также была отмечена высокая активность фермента. Таким образом полученные нами данные могут быть использованы для создания новых биотехнологий получения никотинамидадениндинуклеотида, биологически активного соединения используемого в биологии и в перспективе и в медицине.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ И ПРИСУТСТВИЯ МИКРОМИЦЕТА ТРИХОДЕРМЫ (TRICHODERMA HARZ.) НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (PLEUROTUS OSTREATUS) НА ТВЕРДОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

**Лавлинский А. В., Смирнова Ю. В., Черникова В. В.
Воронежский государственный университет, Воронеж**

Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*(Fr.) Kummer) в условиях культивирования растет практически на любом субстрате, содержащем целлюлозу и лигнин. В процессе её выращивания по наиболее распространенной нестерильной технологии большую опасность для роста и развития мицелия представляют зеленые плесени, особенно виды рода Триходерма, ингибирующие рост грибницы в субстрате, а в некоторых случаях и паразитирующие на ней. Для ускорения протекания технологического цикла выращивания грибов Вешенки обыкновенной и увеличения урожайности существенную роль может сыграть сокращение сроков выращивания и увеличение физиологической активности её мицелия. Одним из способов решения данного вопроса может быть активизация посадочного материала (мицелия) путем воздействия импульсным низкочастотным электромагнитным излучением, положительный эффект которого был показан при обработке семян ряда с/х культур, а также подбор штаммов вешенки с большей конкурентоспособностью к плесневым микромицетам. С целью изучения эффекта влияния электромагнитного излучения низкой интенсивности на рост мицелия наиболее распространенных культивируемых штаммов вешенки - НК-35, К-12, М-5, "Черный принц" - пробирки с их культурами облучали импульсным магнитным полем амплитудой 0, 3 Тл и частотой 10 мс в течение 12 сек. Генератор импульсного магнитного излучения разработан и сконструирован на кафедре ядерной физики ВГУ профессором М. Н. Левиным. Для изучения взаимоотношения указанных штаммов Вешенки обыкновенной с Триходермой (*Trichoderma harzianum*) был также поставлен опыт, в котором инокулюм мицелия данных видов и штаммов был внесен одновременно на твердую питательную среду (основа - агар-агар с ингредиентами) в чашки Петри. Работа проводилась в лаборатории кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ. Велись визуальные наблюдения за ростом и развитием колоний мицелия изучаемых объектов как в опытных вариантах (импульсное магнитное облучение и совместное произрастание с Триходермой), так и контрольных, где были только изучаемые штаммы Вешенки обыкновенной. Также нами количественно определялся линейный рост колоний мицелия во всех вариантах. Результаты обрабатывались статистически. Было выявлено, что импульсное магнитное облучение положительно повлияло на интенсивность роста колоний мицелия всех штаммов Вешенки обыкновенной кроме штамма НК-35. Наиболее высокую скорость роста в опытном варианте показали штаммы М-5 и "Черный принц", которые на 7 день полностью колонизировали мицелием поверхность среды в чашках Петри. Штамм К-12 имел наименьшую скорость роста колоний мицелия и существенно уступал остальным штаммам в опытном варианте, хотя в сравнении с контролем скорость роста его колонии была выше. Наблюдения за ростом 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 закономерность более быстрого роста мицелия вешенки в отсутствии на питательной среде мицелия Триходермы. Исключением, как и в предыдущем опыте, был штамм Вешенки НК-35. Наиболее интенсивный рост мицелия в присутствии Триходермы наблюдался у штамма Вешенки К-12. Полученные нами результаты могут быть использованы в практике промышленного выращивания Вешенки обыкновенной по интенсивной технологии для подбора наиболее конкурентоспособных к Триходерме штаммов.

ПОГРУЖЕННАЯ БИОМАССА *AGROCYBE AEGERITA*, *LENTINUS EDODES*, *LAETIPORUS SULPHUREUS* С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАМИ СВОЙСТВАМИ

Леонтьева М. И.¹, Барков А. В.², Соболева Н. Ю.¹, Исакова Е. Б.¹, Автономова А. В.¹, Бухман В. М.¹, Винокуров В. А.², Краснопольская Л. М.¹

¹ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва.

² Российский государственный университет нефти и газа имени И. М. Губкина, Москва

Базидиальные грибы являются перспективными продуцентами целого ряда биологически активных и хозяйственно ценных метаболитов. Наиболее активно изучают полисахариды клеточной стенки, вторичные метаболиты, ферменты базидиомицетов. В меньшей степени исследователи уделяют внимание липидам базидиальных грибов.

Известно, что за счет наличия в клеточной стенке уникальных по своему строению полисахаридов базидиомицеты способны проявлять выраженные иммуномодулирующие и противоопухолевые эффекты. В составе липидов базидиальных грибов преобладают ненасыщенные жирные кислоты, жизненно необходимые в рационе человека. Таким образом, биомасса ксилотрофных грибов содержит уникальный комплекс биологически активных соединений.

В лаборатории биосинтеза биологически активных соединений разработаны способы погруженного культивирования различных видов ксилотрофных и сапротрофных базидиомицетов. В качестве компонентов сред используют различные источники питания, в том числе отходы производства, трудные в утилизации, такие как барда.

Agrocybe aegerita, *Lentinus edodes* и *Laetiporus sulphureus* являются перспективными продуцентами липидов. Разработаны способы погруженного культивирования, позволяющие получать биомассу грибов, содержащих высокое содержание липидов. Содержание липидов в биомассе *A. aegerita* составляло 26,3%. Мицелий *L. sulphureus*, выращенный в разработанных условиях, содержал 44,7% суммарных липидов. Наибольшее содержание липидов в мицелии *L. edodes* было 42,0%.

Изучение жирнокислотного состава липидов культур *A. aegerita*, *L. edodes* и *L. sulphureus* выращенных в колбах на ротационной качалке на средах, обеспечивающих наибольший выход липидов, показало следующее. Сумма полиненасыщенных жирных кислот в липидных фракциях из мицелия *A. aegerita*, *L. sulphureus* и *L. edodes* была примерно одинакова и составила 71%, 68,3% и 67,9%, соответственно. Основной жирной кислотой в погруженной биомассе всех трех культур была линолевая кислота - полиненасыщенная жирная кислота. На втором и третьем месте среди ненасыщенных жирных кислот в мицелии *A. aegerita*, *L. sulphureus* и *L. edodes* были олеиновая и линоленовая кислоты. Среди насыщенных жирных кислот больше всего в погруженной биомассе изученных культур было пальмитиновой кислоты.

Водные экстракты мицелия *A. aegerita*, *L. edodes* и *L. sulphureus* обладали выраженной противоопухолевой активностью. На модели *in vivo* с подкожно привитым Т-лимфолейкозом Р388 водные экстракты этих грибов показывали следующее торможение роста опухоли: *A. aegerita* - 75-90%, *L. edodes* - 60-80%, *L. sulphureus* - 69-75%.

Работа частично выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОГРУЖЕННОГО МИЦЕЛИЯ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Леонтьева М. И., Автономова А. В., Евсенко М. С., Усов А. И., Исакова Е. Б., Бухман В. М., Краснопольская¹ Л. М.

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

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

Многие базидиомицеты обладают способностью оказывать иммуномодулирующее и противоопухолевое действие. Основными метаболитами, отвечающими за эти свойства, являются полисахариды и их комплексы с белками. Выраженность биологического эффекта может зависеть от видовой принадлежности продуцента, используемого штамма, условий его культивирования.

Цель настоящей работы состояла в разработке способов погруженного культивирования ксилотрофных базидиальных грибов и сравнительном изучении противоопухолевых свойств полученной биомассы. Объектами исследования служили штаммы *Armillaria mellea*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizyguis ulmaruis*, *Lyophyllum shimeji*, *Trametes versicolor* из коллекции НИИНА имени Г. Ф. Гаузе РАМН.

Разработку условий погруженного культивирования начинали с создания композиции жидкой питательной среды для каждого штамма. На первом этапе устанавливали длительность процесса погруженного культивирования исследуемой культуры на специально разработанной универсальной среде. На втором этапе на основе изучения трофических потребностей штаммов базидиомицетов проводили качественный подбор источников углерода, азота, фосфора и микроэлементов. На третьем этапе с помощью методов математического планиро-

вания эксперимента оптимизировали количественное соотношение ранее подобранных источников питания. При проведении оптимизации использовали метод полного факторного эксперимента и метод крутого восхождения.

Создание способов погруженного культивирования исследуемых штаммов и прежде всего разработка жидких питательных сред привели к повышению продуктивности процессов по биомассе и сокращению их длительности. Разработанные способы погруженного культивирования позволили достигнуть следующих выходов воздушно-сухой биомассы: *A. mellea* 20, 9 г/л за 5 суток, *F. velutipes* 35, 4 г/л за 5 суток, *H. ulmaruis* 43, 1 г/л за 3 суток, *L. shimeji* 27, 1 г/л за 4 суток, *T. versicolor* 25, 8 г/л за 3 суток.

Биомасса исследуемых культур, получаемая по предложенным способам их погруженного культивирования, содержала от 9, 2 до 26, 3 % водорастворимых полисахаридов. Изучение моносахаридного состава суммарных фракций водорастворимых полисахаридов мицелия всех изученных штаммов базидиомицетов выявило наличие глюкозы, галактозы, рамнозы, ксилозы, маннозы и арабинозы. У всех штаммов в составе водорастворимых полисахаридов преобладали глюкоза и галактоза.

Изучение противоопухолевой активности проводили в системе *in vivo* на мышцах-гибридах BDF1 с привитым лимфолейкозом Р 388. В качестве испытуемых препаратов использовали водные экстракты погруженного мицелия исследуемых культур и полученные из них суммарные фракции водорастворимых полисахаридов. Полученные средства вводили перорально с помощью внутригастрального зонда ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 суток, начиная с 3-их суток опыта. Все испытуемые материалы показали достоверную противоопухолевую активность. Торможение роста опухоли под их воздействием превышало варьировало в пределах 64–94 %. Наибольшую противоопухолевую активность показали суммарные фракции водорастворимых полисахаридов из погруженного мицелия *F. velutipe* и *H. ulmaruis*.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКТА БИОМАССЫ ГРИБА *FUSARIUM SAMBUCINUM* В РАЦИОНАХ САМОК СОБОЛЕЙ

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

ГНУ НИИПЗК имени В. А. Афанасьева, Родники, Московская обл.

В составе современных рационов зверей целесообразно использовать новые кормовые средства, позволяющие обеспечить животных необходимым набором нутриентов для поддержания жизни и проявления высокой продуктивности.

Для повышения продуктивности соболей предлагается использовать в их рационах биологически активную добавку экстракт биомассы гриба *Fusarium sambucinum* (*F. sambucinum*), полученную путём биотехнологии «Флоравит». Препарат представляет собой композицию биологически активных веществ, продуцируемых мицелиальным грибом *F. sambucinum*. Основными компонентами добавки являются фосфолипиды, свободные жирные кислоты, антиоксиданты, каротиноиды, ферменты, полисахариды, а также витамины А, Е, D₃, Н и группы В. Добавка обладает свойствами биосинергетика, так как применяется для нормализации функциональной активности желудочно-кишечного тракта, печени, коррекции иммунитета (Григораш А. И., Макланов А. И. и др., 2002, 2004, 2008, Лоенко Н. Н., Пучков А., Чернова И. Е., 2007, 2008).

Цель работы — использование экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* для повышения продуктивности самок соболей.

В 2008–2009 гг. научно-хозяйственные опыты проводили на основном стаде самок соболей. Было проведено три эксперимента на 220 самках. По окончании опыта были учтены показатели воспроизводства самок.

Изучили влияние препарата экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* («Флоравит-Э») на репродуктивную функцию самок соболей:

- в периоды истинной беременности и лактации при добавлении препарата в рацион в течение 3–4 месяцев в количестве 1, 0 или 1, 5 мл на голову в сутки ежедневно;
- при введении в течение года добавки по 1, 0 мл на голову в сутки в корм (гон, латентная фаза, истинная беременность и лактация);

В результате проведенных исследований было установлено, что включение в рационы самок соболей в периоды истинной беременности и лактации экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* в количестве 1, 0–1, 5 мл на голову положительно влияет на их воспроизводительную способность. При этом снижается число пропустивших самок на 5, 7–8, 0% и увеличивается выход молодняка на основную самку на 0, 38–0, 35 щенка, соответственно. Применение в течение года в рационах самок соболей экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* по 1, 0 мл на голову в сутки обеспечило лучшую реализацию репродуктивного потенциала взрослых самок по сравнению с коротким периодом использования препарата (истинная беременность, лактация, 3–4 мес.). Выход молодняка увеличился по сравнению с контролем на 0, 62 щенка ($P > 0, 90$), а по сравнению с коротким периодом на 0, 3 щенка. Оптимальный уровень введения кормовой добавки в рационы самок соболей в период истинной беременности составляет 1, 0 мл на голову в сутки, ежедневно.

Проведённые гистологические исследования на материале, полученном от самок соболей позволили установить снижение степени повреждения печени зверей жировой дистрофией при использовании биосинергетика — экстрак-

та биомассы гриба *F. sambucinum*. Также установлено у опытных самок усиление иммунной реактивности к чужеродному белку. Экспериментально обоснованы и доказаны целесообразность применения экстракта биомассы гриба *F. sambucinum* в рационах соболей и положительное влияние препарата на функцию воспроизводства.

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ВЫХОД БИОМАССЫ *SACHAROMYCES CEREVICEA* M-15

Магеррамова С. И., Илясова М. Х., Гурбанова О. А., Гахраманова Ф. Х., Везирова И. А.
Институт Микробиологии НАН Азербайджана, Баку
Азербайджанский Государственный Экономический Университет, Баку

Хлебобулочные изделия – продукты ежедневного потребления, играющие исключительно важную роль в питании. Повышая их пищевую ценность, можно целенаправленно воздействовать на здоровье человека и его трудоспособность, поэтому его качество должно соответствовать всем медико-биологическим требованиям. В этой связи, все большее распространение во всех странах получают программы оздоровления населения путем расширения ассортимента продуктов питания нового поколения, в которых направленно изменен биохимический состав путем обогащения различными биологическими добавками.

Одним из путей решения этих проблем является вовлечение в хозяйственный оборот экологически безопасных нетрадиционных сырьевых ресурсов растительного происхождения, использование которых при производстве продуктов питания позволит обогатить их жизненно важными соединениями до уровня, соответствующего физиологическим потребностям организма.

С этих позиций перспективными обогащающими добавками к хлебобулочным и мучным кондитерским изделиям могут явиться порошки, получаемые из ягод и семян дикорастущих растений, обладающих широким спектром физиологического действия, благодаря богатому набору биологически активных веществ.

Учитывая тот факт, что во флору Азербайджана входит много дикорастущих плодовых растений, в представленной работе попытались уточнить возможности использования таких растений в хлебопечении. Для этого использовали сушеный порошок, полученный из плодов таких растений, как яблоко, мушмула, боярышник, малина и др. . Получение порошка проводилось в такой последовательности: сбор плодов - высушивание под солнцем - измельчение в лабораторной мельнице до вида порошка.

Исследование химического состава полученных порошков показали, что они между собой значительно отличаются. Например, в составе боярышника количество общего сахара составляло 12, 6%, пектина - 9, 0%, белков -10, 2% и крахмала - 8, 5%. Аналогичные показатели у мушмулы составляли 19, 5%, 4, 6%, 9, 5% и 5, 8%, соответственно.

На первом этапе экспериментов полученный порошок был использован для культивирования *Sacharomyces cerevicea* M-15 с целью получения дрожжевой массы, которые необходимо для приготовления теста. Для этого приготовили среду, состоящую из порошка дикорастущих плодов растений (от 1 до 10 г/л). В качестве контроля использовали среду, которая используется в промышленном производстве пекарских дрожжей.

Полученные результаты показали что, при одинаковом времени культивирования, полученные дрожжевые биомассы характеризовались разными величинами, и самая высокая биомасса было получена тогда, когда в среду добавили 5 г/л сухого плодового порошка. При этом во всех случаях биомасса *S. cerevicea* M-15 была 4, 3-7, 6% выше, чем в контроле. Исследование некоторых свойств полученной биомассы гриба, показали, что подъемная сила также увеличивается в 1, 1-1, 2 раза, и при этом вкусовые качества полностью сохраняются.

На втором этапе исследований порошок использовали в качестве добавки к основному материалу (пшеничная мука), которая используется для приготовления теста. Первоначальные результаты показали, что полученные изделия из такого теста по основным биохимическим показателям не уступают продуктам, полученным традиционным способом.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Михайлова О. Б., ¹ Поединок Н. Л., ¹ Дьяков М. Ю., ² Камзолкина О. В. ²

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

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Исследование ферментов грибов необходимо для понимания их физиологии, биохимии, экологии, а также установления признаков, которые могут быть использованы как дополнительные таксономические критерии. В систематике высших базидиомицетов на видовом уровне имеет значение наличие монофенол-монооксигеназ, в первую очередь лакказы, тирозиназы и пероксидазы. Для дереворазрушающих базидиомицетов наличие тех или иных ферментов является важным признаком при определении их систематической принадлежности. Направленный поиск активных штаммов грибов – продуцентов ферментов в природе позволяет уточнить ме-

сто и роль отдельных видов грибов в круговоротах веществ, определить их экологические ниши, отобрать наиболее активные продуценты для биотехнологических целей.

Нами изучена способность грибов разных экологических и систематических групп к продуцированию внеклеточных ферментов, которые характеризуют метаболизм углеродных (амилаза, целлюлаза, α -D-глюкозидаза, ксиланаза, полигалактуроназа, пектат-трансэлиминаза) и азотных соединений (нитрат-редуктаза, уреазы), окислительно-восстановительные процессы (лактаза, тирозиназа, пероксидаза), липидов (липаза). Объектами исследования служили культуры высших базидиальных грибов: 5 видов подстилочных сапротрофов (*Clitocybe nebularis*, *Coprinus comatus*, *Lepista nuda*, *Macrolepiota procera*, *Rhodocollybia maculate*) и 7 ксилотрофных видов (*Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lentinus tigrinus*, *Panellus serotinus*, *Pholiota squarrosa*, *Sparassis crispa*).

Все культуры обнаружили положительную реакцию на наличие лакказы. У сапротрофов *Rhodocollybia maculate*, *Clitocybe nebularis*, *Macrolepiota procera* отмечено отсутствие положительной реакции на наличие пероксидазы, синтез которой наиболее характерный признак для дереворазрушающих базидиомицетов. Наиболее активными культурами, которые проявили положительную реакцию на все три фермента, выявились штаммы *Flammulina velutipes*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Pholiota squarrosa*, *Lepista nuda*.

У всех исследованных культур отмечена четкая положительная реакция на наличие внеклеточной амилазы. Наиболее высокая активность этого фермента отмечена у штаммов *Lepista nuda*, *Coprinus comatus*, *Sparassis crispa*, зона активности фермента была в пределах от 15 до 20 мм. У *Kuehneromyces mutabilis*, *Pholiota squarrosa*, *Rhodocollybia maculate*, *Flammulina velutipes* зона активности амилазы – 4-5 мм. У оставшихся видов эта зона зарегистрирована непосредственно под мицелиальной колонией.

Все исследованные виды дали четкую позитивную реакцию на целлюлазу и α -D-глюкозидазу. Хотя зона активности ферментов отличалась у некоторых штаммов интенсивностью и зоной распространения. Наибольшую активность проявили культуры дереворазрушающих грибов: *Lentinus tigrinus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Flammulina velutipes*, у грибов которые принадлежат к подстилочным сапротрофам наиболее активными выявились *Macrolepiota procera*, *Lepista nuda*, *Coprinus comatus*.

Исследованные нами культуры не проявили четкой позитивной реакции на наличие ксиланазы и нитрат-редуктазы.

В результате проведенного скрининга отобрано ряд штаммов, у которых, при наличии активности ферментов целлюлазного комплекса была высокая активность ферментов окислительно-восстановительных процессов: *Flammulina velutipes*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lentinus tigrinus*. Работы проведены при поддержке Фондов Фундаментальных Исследований Министерства науки Украины (Проект № Ф28. 4/016) и РФФИ-09-04-90428-Укр_ф_а-2009.

ПОИСК МИКРОМИЦЕТОВ, СПОСОБНЫХ УТИЛИЗИРОВАТЬ АЦК

Никонов И. Н., Ячиновский И. С., Сафронова В. И., Белимов А. А.

Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург

АЦК (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат) является предшественником в биосинтезе фитогормона этилена у растений. Фермент АЦК-деаминаза (КФ: 4. 1. 99. 4) обнаружен у бактерий и грибов и катализирует разложение АЦК до аммиака и альфа-кетобутирата. Данный фермент играет важную роль в стимуляции роста растений ризосферными бактериями в неблагоприятных условиях среды, поскольку АЦК-утилизирующие бактерии снижают степень ингибирования роста растений стрессовым этиленом (Glick et al., 1998; Belimov et al, 2001). Однако о распространении АЦК деаминазы у микромицетов имеются лишь отрывочные сведения. Поэтому поиск грибов-продуцентов АЦК-деаминазы является актуальным.

В работе использовали около 150 штаммов микромицетов, относящихся к различным экологическим группам, отобранным из коллекций непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ВНИИСХМ и лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР. Грибы культивировали на агаризованной среде Чапека с модификациями по источнику азота: без азота; NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, или АЦК (300 мг/л). Определяли скорость роста, ростовые коэффициенты и морфолого-культуральные характеристики. Утилизацию АЦК оценивали путём сравнения ростовых коэффициентов штаммов на всех вариантах сред на 3, 5 и 7 сутки.

В ходе опытов было установлено, что грибы-лигнотрофы родов *Coriolus* и *Trichoderma* способны утилизировать АЦК. У грибов-фитопатогенов рода *Fusarium* выявлена значительная видовая и штаммовая вариабельность по способности утилизировать АЦК. Активный рост на средах с добавлением АЦК обнаружена у *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. solani* и *F. sporotrichoides*. У 2-х штаммов *F. culmorum* АЦК-деаминазная активность не выявлена. Представители сапрофитных грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* также характеризовались широкой изменчивостью по АЦК-утилизирующей способности, которая была выявлена у *A. nidula*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *P. albocinerescens*, *P. ferrucossum* и *P. italicum*. Однако способность утилизировать АЦК не была обнаружена у грибов рода *Alternaria*.

Таким образом, способность утилизировать АЦК является распространенным признаком у представителей изученных таксономических и экологических групп грибов. Ряд штаммов отобран для количественного определения ферментативной активности АЦК-деаминазы.

Работа была поддержана грантами РФФИ 09-04-01614-а и 10-04-01157-а.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В BIOTEKHOLOGИИ ПЕРЕРАБОТКИ ТВЕРДЫХ ОТХОДОВ

**Обрезкова Н. В., Белова Н. В., Шамолина И. И., Плотникова О. Д.
Санкт-Петербургский государственный университет технологии и дизайна,
Ботанический институт имени В. Л. Комарова, Санкт-Петербург**

Одним из перспективных направлений биоконверсии растительных субстратов становятся технологии с использованием деструктурирующих высших базидиальных грибов. Обладая способностью интенсивно разлагать растительные субстраты, в том числе лигноцеллюлозные отходы ряда производств, они позволяют повысить эффективность использования растительных ресурсов в различных биотехнологических процессах.

Плодовые тела многих деструктурирующих базидиальных грибов съедобны и их используют в пищу. Разработка эффективных методов выращивания плодовых тел и глубинного культивирования мицелия этих грибов позволяет в значительной степени покрыть дефицит белка в пищевом рационе людей и кормах сельскохозяйственных животных.

Цель данного исследования – поиск и сравнение новых решений по утилизации отходов в области переработки невозвратных отходов, которые образуются при переработке растительного сырья и могут быть утилизированы благодаря активности ферментных препаратов, образуемых высшими базидиальными грибами. Вывоз и захоронение рассмотренных отходов на полигоны сопряжены с материальными затратами и высоким экологическим риском, при этом в местах накопления отходов создаются условия для возникновения пожаров и распространения инфекций.

Патентный поиск и анализ научно-технической документации за период с 1995 по 2008 год показал, что на сегодняшний день активно развиваются исследования по культивированию базидиальных грибов на различных отходах для получения белковой массы. Использование предлагаемых питательных сред позволяет увеличить выход биомассы, сократить время культивирования, а также снизить себестоимость целевого продукта. Кроме того такой подход способствует расширению сырьевой базы лекарственных базидиальных деструктурирующих грибов (р. *Ganoderma*). Способ получения пищевой и кормовой биомассы *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* и *Pleurotus pulmonarius*, выращиванием на питательных средах на основе отходов спиртового производства (твёрдой фазы постспиртовой барды) позволяет получать безопасные грибные продукты пищевого и лечебного назначения. В исследованиях авторов установлено, что на питательных средах, включающих отходы прядильно-ткацкого и отделочного производств, можно выращивать базидиомицеты *Pholiota highlandensis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes maxima*, *Trametes ochracea* для технических целей

Ферментные препараты, получаемые с использованием базидиальных грибов, определяют возможность их использования для деградации ксенобиотиков. Окислительные ферменты, образующиеся в процессе выращивания базидиомицетов на средах с шерстьсодержащими отходами, могут представлять интерес для практического использования в процессах биоремедиации.

ЛОНГОЛИТИН РАСТВОРЯЕТ ПОДКОЖНЫЕ ГЕМАТОМЫ

**Подорольская Л. В., Серебрякова Т. Н., Шаркова Т. С., Хромов И. С., Тарантул В. З.
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Институт молекулярной генетики РАН, Москва**

Лонголитин - препарат, выделенный из культуры низшего гриба *Arthrotrichum longa*, уже давно изучается как тромболитическое средство, демонстрируя в эксперименте высокую способность растворения тромбов как при внутривенном введении, так и при наружном применении на тромбированном участке сосуда. Проводимые до настоящего времени экспериментальные исследования касались лизиса тромбов в крупном кровеносном сосуде, как правило, вене. Однако вполне возможно, что прочный комплекс протеаз лонголитина, составляющий его активное тромболитическое начало, способен расщеплять и белые тромбоцитарные тромбы, формируемые преимущественно в артериях, и фибриновые отложения в сосудах и полостях, и микротромбы в системе микроциркуляции и т. д.

В данной работе изучали действие лонголитина на поверхностные подкожные гематомы, образуемые введением небольшого объема (0, 2 мл.) собственной крови животного (крысы) под кожу над грудиной (первая точка) и в 2-х точках по бокам туловища в надпаховой области справа и слева.

В нашем случае подкожная гематома представляла сгусток свернувшейся крови, взятой без антикоагулянта из яремной вены крысы, т. е. содержала все компоненты венозного тромба, но расположенного под кожей, что визуально выглядело как хорошо просматриваемое синюшное пятно площадью (произведение двух взаимноперпендикулярных размеров гематомы) от 96 до 1050 мм² в области шеи над грудиной и 24-320 мм² на боках. Ежедневно в течение 6 дней гематомы смазывали либо препаратом лонголитина (3% раствор лонголитина в глицерине с гепарином - 10 ед./мл.) - 14 опытных животных, либо гепарином (13 контрольных крыс), либо троксевазином (1% аптечный гель), который, как известно, является «золотым стандартом» лечения поверхностных гематом (13 крыс-

2-ой контроль). Кроме того была 3-я контрольная группа крыс – 6 животных), которым гематомы смазывали растворителем- инертным глицерином. Наблюдали 6 дней, каждый день измеряя площадь оставшейся гематомы.

Результаты показали, что при примерно одинаковой усредненной площади образовавшихся гематом у животных опытной и контрольной групп в области шеи- 300-400 мм² - время их растворения (рассасывания) было различным: 6, 1 день в 3-ей контрольной группе, 5, 33 дня в случае троксевазина, 5, 1 день при применении гепарина и 3. 75 дней в случае лонголитина. Скорость растворения гематом (отношение начального размера гематомы ко времени полного растворения) также была максимальной при использовании лонголитина – 76мм² / день, гепарина -67мм²/день, троксевазина – 64мм²/день и глицерина 50, 5 мм²/день. Примерно такие же результаты были получены для гематом в надпаховой боковой области. В ряду: лонголитин>гепарин>троксевазин>глицерин скорости растворения гематом (мм²/день)справа были соответственно 48, 5>34, 8>35, 2>15, 6, и слева: 48, 2>37, 7>32>26, 5. Скорость зависела от размера гематомы и, как в случае лизиса наружных тромбов, была большей для больших гематом. Кроме того она была максимальной в первый день процесса растворения, постепенно уменьшаясь в последующие дни.

Таким образом препарат лонголитина с гепарином ускоряет растворение поверхностных подкожных гематом при сопоставлении с препаратами сравнения- гепарином и троксевазином. Этот факт имеет несомненно важное значение при огромном количестве косметических операций в настоящее время на туловище и особенно на лице. Появление гематом в них нежелательно и является дефектом, и выявление способов ускорения их рассасывания чрезвычайно актуально.

ПРИМЕНЕНИЕ ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ЛЕЧЕБНЫХ ГРИБОВ В ПТИЦЕВОДСТВЕ

Польских С. В., Аксеновская В. Е., Федюшина В. А.

Воронежский Государственный Аграрный университет имени К. Д. Глинки

Новая кормовая добавка зерновой мицелий высших базидиальных лечебных грибов (ЗМВБЛГ) (на данный момент происходит регистрация препарата и присуждение торгового названия) - комплексный препарат, созданный на основе известного зернового мицелия высших базидиальных грибов, в состав которого входят аминокислоты.

Кормовая добавка (ЗМВБЛГ) обладает стимулирующим действием, активизирует процессы обмена и кроветворения, биосинтез белка и окислительно-восстановительные реакции в клетках, повышает активность ферментов. Под действием препарата происходят направленные изменения к интенсивному наращиванию живой массы, стабилизируется функциональное состояние центральной и периферической нервной системы, стимулируются процессы регенерации клеток, повышается иммунитет и нормализуется витаминный обмен.

Кормовая добавка (ЗМВБЛГ) экологически безопасна.

Результаты экспериментальных исследований и многолетних производственных испытаний показали высокую эффективность применения кормовой добавки (ЗМВБЛГ) в птицеводстве.

В птицеводстве кормовая добавка (ЗМВБЛГ) используется для увеличения массы птицы, улучшения качества мяса, яиц, сокращения откормочного периода, укрепления иммунитета животных, повышения сопротивляемости организма животных к различным заболеваниям и т. д. Препарат значительно снижает падеж молодняка, повышает его жизнеспособность, помогает ослабленным птицам быстро наверстать в своём развитии остальной молодняк. Биологическая эффективность действия (ЗМВБЛГ) особенно возрастает в стрессовых ситуациях, когда птицы подвергаются действию неблагоприятных условий окружающей среды (переохлаждение или перегрев, резкие перепады температур и давления, сквозняки, неполноценность или недостаток кормов, плохие условия содержания, высокий инфекционный фон).

Производственная проверка препарата прошла испытания и проверку в производственных условиях в ОАО «Красногорского Агропромышленного Общества», ОАО ПЭ «Константинове» и свинокомплексе «Кузнецовский» Московской области, Россошанской птицефабрике и ООО Липецк-Молоко, где была подтверждена высокая эффективность препарата.

Применение препарата (ЗМВБЛГ) при выращивании цыплят и откорме бройлеров позволяет:

- экономить 190-220г корма на 1кг прироста живой массы;
- увеличить убойный вес птиц на 10-15%;
- снизить смертность (отход) цыплят на 40 - 50%;
- сократить сроки откорма;
- повысить привесы бройлеров на 5-10%;
- повысить устойчивость к инфекционным и простудным заболеваниям, а также стрессам;
- улучшить химический состав мяса, придавая ему диетическую чистоту и вкус;
- отказаться от применения гормональных добавок в кормах;

Поиск и изучение культур базидиомицетов – активных продуцентов окислительных ферментов

Псурцева Н. В., Шахова Н. В., Шевченко М. В., Яковлева Н. С.

Ботанический институт имени В. Л. Комарова РАН, Санкт–Петербург

Базидиальные грибы обладают высоким биосинтетическим потенциалом, продуцируя широкий спектр ферментов и биологически активных веществ. Окислительные ферменты грибов (лакказы, лигнинпероксидазы, марганец зависимые пероксидазы, полифенолоксидазы, тирозиназы и др.) играют важную биологическую роль, участвуя в разложении лигнина и утилизации древесных остатков в природных экосистемах. Эти ферменты имеют также большое практическое значение для деятельности человека, их используют при переработке древесины, в бумажном, текстильном и ряде других производств. Несмотря на то, что в настоящее время из культур базидиомицетов уже выделено, очищено и охарактеризовано свыше 100 ферментных препаратов, поиск новых видов грибов, активных продуцентов окислительных ферментов, остается актуальным. Традиционно считается, что наиболее активные продуценты окислительных ферментов – афиллофороидные ксилотрофы, однако лакказы были обнаружены и у агарикоидных грибов, в том числе, гумусовых и подстилочных сапротрофов.

Скрининг штаммов из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН (ЛЕ-БИН), проведенный несколько лет назад с применением эколого-таксономического подхода, показал, что культуры 255 видов агарикоидных, афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов, проявляли позитивную реакцию на лакказу. При этом высокая лакказная активность была отмечена у культур 108 видов из различных таксономических и экологических групп. Анализ полученных данных позволил выявить закономерности расположения таксонов активных продуцентов лакказ в современной системе грибов. Было показано, что наибольшим лакказным потенциалом обладали штаммы грибов из сем. *Polyporaceae* и *Steccherinaceae*. Для получения новых штаммов грибов, активных продуцентов окислительных ферментов, пополнение коллекции ЛЕ-БИН проводили с акцентом на выделение в культуру ксилотрофных грибов, принадлежащих к этим семействам. Культуры из сем. *Polyporaceae* широко известны как продуценты окислительных ферментов. Особенно хорошо исследованы представители родов *Cerrena*, *Corioloropsis*, *Russuloropus* и *Trametes*. Семейство *Steccherinaceae* в этом отношении менее изучено.

Целью настоящей работы явилось изучение культурально-морфологических особенностей и окислительно-го потенциала ксилотрофных макромицетов сем. *Steccherinaceae*. Коллекционные штаммы из родов *Antrodiella* (4 вида/ 5 штаммов), *Irpex* (1/ 6), *Junghuhnia* (1/ 1) и *Steccherinum* (3/ 10) культивировали на стандартных агаризованных средах для получения ростовых, макро-и микроморфологических характеристик с использованием классических методов. Скрининг штаммов на активность окислительных ферментов проводили экспресс методом по субстратам: гваякол, сингалдазин и L-тирозин. Глубинное культивирование вели на жидких средах разного состава с целью подбора оптимальных условий для биосинтеза ферментов. За основу была выбрана полусинтетическая глюкозо-пептонная среда. В качестве индуктора биосинтеза лакказ использовали CuSO_4 .

В результате были получены новые данные о культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностях роста и развития базидиальных макромицетов из сем. *Steccherinaceae*. Некоторые виды были впервые изучены в условиях чистой культуры. Полученные данные явились основой для верификации коллекционных штаммов и в дальнейшем послужат для контроля чистоты культур в случае их использования в биотехнологии. Были отобраны новые штаммы *Antrodiella faginea*, *Junghuhnia nitida*, *Steccherinum murashkinskyi* и *S. ochraceum*, которые при глубинном культивировании проявляли высокую лакказную активность. Добавление индуктора в среду культивирования приводило к значительному повышению ферментативной активности и позволяло получать для отобранных продуцентов активность 100-150 U/ml.

РАЗРАБОТКА ПРОДУКТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ

Пучкова Т. А.¹, Трухоновец В. В.², Бабицкая В. Г.¹, Щерба В. В.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

²Институт леса НАН Беларуси, Минск

Плодовые тела многих макромицетов обладают ценными лекарственными свойствами, что подтверждает многолетний опыт их использования в народной медицине разных стран. В последние годы наблюдается заметный интерес к созданию на основе высших грибов биологически активных добавок к пище. Разработка технологий искусственного культивирования позволяет выращивать плодовые тела ценных лекарственных грибов, не произрастающих в климатических условиях Беларуси, и получать экологически чистую пищевую продукцию.

Проведено сравнительное изучение биохимического состава плодовых тел грибов класса *Basidiomycetes* родов *Auricularia*, *Ganoderma*, *Inonotus*, *Fomes*, *Hericium*, *Laetiporus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*. Плодовые тела выращивались по технологии, разработанной в Институте леса НАН Беларуси на твердых питательных субстратах, содержащих в различных соотношениях солому, опилки березы, осины, дуба, отруби, зерно. Содержание

основных биохимических компонентов составило: общий белок – 10, 9–28, 0%, истинный белок – 6, 5–19, 50%, липиды – 2, 1–6, 0%, полисахариды – 5, 7–20, 6%, фенольные соединения – 250–2240 мг%.

Биологическую активность большинства грибов во многом определяют соединения углеводной природы, содержание которых достигает до 50% от сухой биомассы грибов. Они представлены свободными и связанными сахарами, а также полисахаридами. Среди исследованных грибов наибольшее содержание полисахаридов отмечено у *S. commune*, *G. applanatum*, *G. lucidum* и *L. edodes*.

В качестве продуцентов продуктов функционального назначения отобраны штаммы *G. lucidum* и *S. commune*, синтезирующие большое количество полисахаридов 12, 0–22, 6% и дающие высокий урожай плодовых тел в искусственных условиях на твердых питательных субстратах. Хотя данные грибы не являются съедобными, они очень ценятся в странах Юго-Восточной Азии благодаря лекарственным свойствам. Они являются продуцентами иммуностимулирующих полисахаридов ганодерана и шизофилана, препараты на основе которых используются для повышения иммунитета, профилактики и лечения некоторых онкологических и хронических инфекционных заболеваний.

Установлено, что полисахариды плодовых тел грибов *G. lucidum* и *S. commune* стимулировали фагоцитарную активность нейтрофилов в концентрации свыше 100 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации полисахаридов незначительно влияло на изменение показателей. Полученные данные согласуются с результатами исследований иммуностимулирующей активности полисахаридов плодовых тел грибов *G. lucidum*, *Lentinus edodes* и *Crinipellis schevzenkovi*.

Антиоксидантная активность спиртовых экстрактов плодовых тел *G. lucidum* составляла 84, 0–95, 0%, *S. commune* – 80, 0–88, 5 %.

Установлено наличие сорбционных свойств как у *S. commune*, так и у *G. lucidum*. Сорбционная активность *G. lucidum* по отношению к ионам меди составила в среднем 1, 1–2, 4 мг/г, что сравнимо с аналогичными показателями энтеросорбента на основе лигнина «Полифепан». Сорбционная активность *S. commune* оказалась значительно ниже (0, 6–0, 69 мг/г).

БИОСИНТЕЗ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ КСИЛОТРОФНЫМИ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ СЕМЕЙСТВА CORIOLASEAE

Рагимова М. М., Мурадов П. З.

Бакинский Государственный Университет, Баку
Институт Микробиологии НАН Азербайджана

Ксилотрофные базидиомицеты, особенно возбудители белой гнили, являются одним из микроорганизмов, способных активно разрушать лигнин. Они синтезируют мультиферментный комплекс лигнолитического действия, принимающий участие в процессе деградации лигнина.

Характерными представителями дереворазрушающих грибов в природных экосистемах являются грибы семейства Coriolaseae, многие представители которых относятся к возбудителям белой гнили, и являются предметом изучения многих исследователей, в целях получения биомассы, противоопухолевых и других физиологически активных соединений.

Внеклеточные ферментные системы дереворазрушающих грибов, как правило, включают спектр окислительных ферментов (лактаза, лигнинпероксидаза, марганецпероксидаза), которые принимают участие в расщеплении лигнина, однако физиологическая роль некоторых из этих ферментов до настоящего времени точно не установлена. Поэтому исследование окислительных ферментов ксилотрофных грибов на примере данного семейства представляет несомненный интерес как с точки зрения изучения метаболизма грибов белой гнили, так и с позиции применения данного организма для получения препаратов, которые могут использоваться в различных областях биотехнологии.

В связи с этим, целью представленной работы явилось подбор активного продуцента лигнолитических ферментов и изучение некоторых свойств лигнолитического комплекса отобранного продуцента.

Для достижения поставленной цели первоначально был проведен скрининг 30 штаммов ксилотрофных базидиальных грибов (*Cerrena unicolor* -7 штаммов, *Daedaleopsis confragosa* -2, *Lenzites betulina* – 3, *Pycnoporus cinnabarinus* – 3, *Trametes cervinus* -1, *T. hirsuta* – 6, *T. pubescens* – 3 и *T. versicolor* –5), которые в ходе исследований нами, были выделены из плодового тела грибов, взятых из экологически разных лесов Азербайджана.

На агаризованном сусле с галловой кислотой (метод Бавендамма) все штаммы давали положительную реакцию на экстрацеллюлярные фенолоксидазы и самые большие окрашенные зоны (более 40 мм на 4 сутки роста) отмечены у *T. hirsuta*, *C. unicolor* и *T. versicolor*. Исключение составляли штаммы гриба *T. pubescens*, активность окислительных ферментов у которых обнаруживается, только начиная с 7 сутки культивирования, и на 10-е сутки культивирования диаметр окрашенной зоны составлял 5 мм.

Определение активности экстрацеллюлярных оксидаз в условиях глубинного культивирования показали наличие у всех видов значительной штаммовой вариабельности по этому признаку. Все изученные штаммы вида *T. pubescens* обладали низкой оксидазной активностью, вплоть до нулевой. Наиболее активными были штаммы видов *T. hirsuta* D-5 и *C. unicolor* M-2. Расчет показал, что по продуктивности именно эти штаммы являются лучшими, что служило основой для выбора их в качестве активного продуцента для дальнейших работ.

Показано, что грибы максимальную активность проявляют на средах, где источником единственного углерода являются пшеничные отруби (8-10 г/л), дополнительного азота NH_4NO_3 . При этом начальный pH среды должен составлять 4, 8-5, 2, а температура выращивания - 30-32°C.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ МИТОТОКСИНА ИЗ ГРИБОВ ASPERGILLUS

Свирщевская Е. В., Деменьтьева Д. В., Зубков Д. А.

Институт биоорганической химии РАН, Москва

Введение: В ряде работ было показано, что споры гриба *Aspergillus fumigatus* (AF) вызывают апоптоз в эпителиальных клетках легких. С другой стороны имеются данные о противоопухолевом эффекте ряда микотоксинов. Так, из грибов AF выделен спиротрипростатин В, обладающий активностью, ингибирующей пролиферацию опухолевых клеток. Целью данной работы был подбор условий культивирования и анализ противоопухолевой активности культуральной среды грибов AF, пенициллум, мукор, трихофитон, дрожжей сахарамицес.

Методы: Анализ цитостатической активности *in vitro* проводили на линиях опухолевых клеток HaCaT, EL-4, Jurkat и Wnt-1 с помощью МТТ теста. Анализ *in vivo* проводили в модели рака молочных желез мышей C57BL/6, вызванного гиперэкспрессией гена Wnt-1.

Анализ молекулярной массы микотоксина определяли с помощью диализа. Температурную устойчивость анализировали, инкубируя культуральную среду 5 мин при 40, 50, 60, 70, 80 и 90 градусах. Анализ апоптоза проводили с использованием красителей MitoT Red и NAO через 1, 2, 3 и 4 часа после добавления 10% культуральной жидкости. Апоптоз анализировала с использованием клеток HaCaT с помощью конфокальной микроскопии.

Результаты. Анализ 3 штаммов грибов пенициллум, 1 штамма мукор, двух штаммов трихофитона, 1 штамма дрожжей, а также 5 штаммов AF показал, что культуральная жидкость всех штаммов AF, но не прочих грибов оказывает цитотоксический и цитостатический эффект на клетки линий HaCaT, EL-4, Jurkat и Wnt-1 дозозависимым образом. Активность наблюдали при росте AF на среде Сабуро, мальтозе, глюкозе, культуральной среде для клеток млекопитающих RPMI-1640. Прогревание культуральной жидкости AF при 70°C полностью инактивировало активность микотоксина. Диализ такой жидкости в течение ночи также приводил к потере активности. Фильтрация культуральной жидкости на амиконовской ячейке с размером пор 5 кДа показала, что цитотоксическая активность содержится в фильтрате с массой менее 5 кДа. Анализ механизма действия показал, что уже в течение 4 ч наблюдается апоптоз опухолевых клеток. Введение три раза в неделю по 200 мкл на мышь культуральной жидкости AF приводило к подавлению роста опухоли уже через 2 недели после начала лечения. Заметной токсичности *in vivo* при этом не было. Мыши не теряли вес.

Вывод. Грибы AF продуцируют микотоксин, который может быть использован как противоопухолевый препарат.

АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТЕРИЛИЗУЮЩИХ МЕМБРАН ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА «ГЛЮКОЗООКСИДАЗА PFC»

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

ГНУ Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Глюкозооксидаза (β -D-глюкозо:O₂-оксидоредуктаза, КФ 1. 1. 3. 4) – ФАД-содержащий фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление глюкозы до глюконо-1, 5-лактона и пероксида водорода. Фермент широко используется в пищевой, химической промышленности и медицине.

В настоящее время в Институте микробиологии НАН Беларуси в рамках ГНТП «Промышленные биотехнологии» разрабатывается технология производства препарата «Глюкозооксидаза PFC». В качестве продуцента фермента используется мицелиальный гриб *Penicillium funiculosum* 46. 1. В современной биотехнологии для стерилизации ферментных препаратов широкое распространение получил метод микрофильтрации.

Цель данной работы – подбор стерилизующих мембран для получения препарата «Глюкозооксидаза PFC». В работе использовали фильтр-картон ЕК («Pall Seitz Schenk», Германия), полиамидную мембрану ПА-0, 45 (НММП 0, 45 мкм, «Мифил», Беларусь), пропиленовые мембраны Prewflow (НММП 0, 2 мкм и 0, 45 мкм, «PALL», Германия).

Образцы препарата «Глюкозооксидаза PFC» для микрофильтрации получали из культуральной жидкости *P. funiculosum* 46. 1 последовательным концентрированием и очисткой фермента на системе ультрафильтрационных установок (половолоконных мембранных разделительных элементах МПВЭ ПС-10М-1, 0, МПВЭ ПС-10М-0, 2 (мембрана ПС-10М) (МИФИЛ, Беларусь) и мембранном фильтре с радиальным перемешиванием (мембрана УПМ-20, «Владипор», Россия). Удельная активность препарата составила 89 ед/мг белка.

Установлено, что все исследуемые фильтры характеризовались низкой удельной производительностью, при этом снижение их проницаемости происходило в основном на начальном этапе фильтрации. В конце процесса удельная производительность мембран не превышала 11-14 л/м²·мин. Максимальная скорость фильтрации отмечалась при использовании мембран с НММП 0, 45 мкм независимо от фирмы производителя.

Следует отметить, что после микрофильтрации значения кислотности образцов препарата «Глюкозооксидаза PFC» (pH=4, 6) не менялись. Показано, что в образцах наблюдается незначительное снижение (2, 8-8, 1%) ферментативной

активности. Наименьшие потери по активности выявлены в образцах препарата, полученных после микрофилтрации через мембраны Prewlow 0, 2 мкм (4, 4%), Prewlow 0, 45 мкм (2, 8%). Потери по белку обнаружены только в случае применения для микрофилтрации фильтр-картона ЕК и полиамидной мембраны ПА-0, 45 и составляли 9, 0 и 2, 2%.

Установлено, что нестерильный препарат «Глюкозооксидаза PFC» контаминирован мезофильными бактериями и дрожжами ($5,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл). Анализ стерильности образцов препарата, полученных после микрофилтрации через исследуемые мембраны, показал, что полное отсутствие контаминирующей микрофлоры в препарате «Глюкозооксидаза PFC» обеспечивает филтрация через полипропиленовую мембрану Prewlow 0, 2 мкм. В остальных случаях в образцах препарата было обнаружено $2 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, что не превышает максимального допустимого значения гигиенических нормативов безопасности ферментных препаратов ($5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, СанПиН 13-10 РБ 2002) и разрешает их применение.

Таким образом, анализ эксплуатационных характеристик мембран и показателей стерильности образцов препаратов после микрофилтрации свидетельствует о возможности использования всех исследуемых мембран в производстве ферментного препарата «Глюкозооксидаза PFC». Наилучшие результаты получены с применением полипропиленовой мембраны Prewlow 0, 2 мкм («PALL», Германия).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРИБНОГО ПРЕПАРАТА МИКОТОН В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Сенюк О. Ф., Курочко Н. Ф., Горовой Л. Ф.

Институт проблем безопасности АЭС НАН Украины, Чернобыль

Госпиталь инвалидов Великой отечественной войны, Луцк

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

При старении доминирует накопление в клетках не устранимых продуктов обмена веществ и свободных радикалов. Нарастающая с возрастом недостаточность систем антиоксидантов способствует повреждению свободными радикалами важнейших структур клетки – мембран лизосом, увеличивая ее проницаемость для нуклеаз, которые повреждают клеточный геном после выхода в цитоплазму. В крови увеличивается количество липидов и липидоподобных соединений, неэтерифицированных жирных кислот, триглицеридов.

Препарат Микотон создан на основе комплекса биополимеров базидиального гриба *Fomes fomentarius* и содержит 70 % хитина, 20 % β -глюканов и 10 % меланинов. Он не токсичен и лишен побочных эффектов даже в больших дозах. Ему присущи выраженные детоксикационные, генопротекторные, иммуномодулирующие, антиоксидантные, антихолестеринемические и антиинфекционные свойства. Минздрав Украины разрешил использование его в качестве биологически активной диетической добавки.

В Областном госпитале инвалидов ВОВ, г. Луцк, на 496 больных старческого возраста (от 72 до 89 лет) исследовали Микотон с целью оптимизации базовой терапии. Среди них наблюдали 202 пациента с ишемической болезнью сердца с декомпенсированной сердечной недостаточностью II Б – III ст., 33 больных с сахарным диабетом тип 2, осложненным ангиопатиями, полинейропатиями, гепатопатиями; 148 пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями легких; 20 лиц с пептической язвой желудка и 12-перстной кишки, 71 больной с эрозивным гастродуоденитом; 12 пациентов с циррозом печени и 12 с ревматоидным артритом. 124 пациента принимали Микотон перорально по 0, 5 г дважды на день на протяжении трех недель.

У пациентов, принимавших грибной препарат Микотон, по сравнению с больными контрольных групп раньше наблюдалось снижение эндотоксикоза, улучшение самочувствия на фоне стабилизации симптомов и их обратное развитие. После курса микотонотерапии у пациентов с сердечной недостаточностью резко снижались уровень С-реактивного белка, серомукоида, креатинина и мочевины; у пациентов с легочной патологией нормализовалась лейкограмма на фоне снижения С-реактивного белка и фибриногена, у диабетических больных имело место более выраженное снижение содержания сахара в крови и в моче, а также мочевины, а у язвенников раньше исчезал болевой синдром и в два раза быстрее эпителизировались дефекты слизистой в желудке и 12-перстной кишке. У больных с циррозами на фоне увеличения основного белка (на 25 %) и фибриногена (на 40%) уменьшались признаки интоксикации – в 1, 5 раза снижались уровень мочевины и креатинина. У больных ревматоидным артритом на фоне снижения признаков общевоспалительной реакции (уменьшение СОЭ в 2 – 3 раза, С-реактивного белка с +++ до +, уровня фибриногена в два раза) появилась возможность уменьшить в восемь раз дозу стероидных гормонов (с 40 мг до 5 мг в сутки). Таким образом, введение Микотона в комплекс лекарственных средств позволяет оптимизировать лечение за счет увеличения адаптационных возможностей стареющего организма. В определенных случаях этот грибной препарат может быть эффективен как самостоятельное лекарственное средство, но его истинный потенциал проявляется при использовании в качестве дополнения к базовой терапии при широком спектре заболеваний.

ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАНТА СОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТАВ ЛИПИДОВ *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ТНОМ

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

Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

В последние годы борьба с мицелиальными грибами на производствах пищевых продуктов заняла особое место в биотехнологии. Ранее были изучены виды грибов, поражающих пищевые изделия, в частности твердые сыры. Наиболее часто встречающимися контаминантами сыров являются грибы аскомицетного аффинитета, у которых доминантная роль принадлежит пенициллам, составляющим до 80% от заражающих микроорганизмов, значительно менее распространены мукооровые грибы. Перспективным способом для сохранения пищевых изделий, например, твердых сыров, является использование консервантов, среди которых одним из наиболее широко применяемых препаратов является сорбиновая кислота и ее соли. Однако, несмотря на то, что сорбиновая кислота (СК) давно используется в пищевой индустрии, биохимический механизм ее действия на грибы остается не выясненным.

Данные, полученные при изучении влияния СК на рост *P. roqueforti*, показывают, что присутствие в среде культивирования СК в концентрациях 0.1% (8.9 мМ) и 0.3% (26.8 мМ) подавляет активность ростовых процессов, и к 72 ч. процент ингибирования составляет соответственно 79.3% и 83.4%.

Консервант значительно влияет на процесс липидообразования гриба. Показано, что СК оказывает существенное влияние на состав фосфолипидов мембраны, в частности на массивные липиды – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, а также на содержание стерина. Изменение состава фосфолипидов сопровождается модификацией их ацильных цепей. Под действием СК уменьшается степень ненасыщенности фосфолипидов: увеличивается содержание пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) и моноеновых жирных кислот, особенно олеиновой ($C_{18:1}$). Кроме того, в составе мембранных фосфолипидов гриба резко уменьшается содержание линолевой кислоты ($C_{18:2}$), которая является основной ненасыщенной жирной кислотой, контролирующей такую важную часть метаболизма, как реакции адаптации. Это позволяет предположить, что СК воздействует на Д12 десатуразу, фермента, ответственного за процесс десатурации олеиновой кислоты в линолевую.

Таким образом, изменения в активности Д12 десатуразы являются тем основным звеном метаболизма, который ингибируется СК и приводит к подавлению ростовых процессов. Вероятно, определенное значение в этом процессе принадлежит также изменениям в соотношении массивных фосфолипидов мембран и их участию в процессах десатурации, а также адаптационной системе «стерины – эфиры стерина», которая также участвует в контроле микровязкости липидного бислоя и подвергается изменениям под действием консерванта.

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ, СПОСОБНЫХ К ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Старкова Е.В., Синцов К.Н., Дурнев Е.А., Береснева И.С., Мартинсон Е.А., Литвинец С.Г.
Вятский государственный университет, Киров

Лигнин составляет около 20-30% от массы сухого вещества древесины. Это достаточно прочно связан с целлюлозой и гемицеллюлозами биополимер ароматической природы, высокоустойчивый к химическому и биологическому воздействию. В то же время, известно, что лигнин в качестве субстрата для роста может использовать широкий круг микроорганизмов и, в первую очередь, базидиальные грибы, вызывающие белую гниль древесины (*Polyporus versicolor*, *Poria subacida*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete*, *Coriolus*, *Phlebia*). Перспективными продуцентами лигнинразрушающих ферментов являются также микромицеты родов *Penicillium* и *Aspergillus*, а также несовершенные грибы (*Fusarium*, *Alternaria* и *Trichoderma*). Биодegradация лигнинсодержащего сырья может быть использована при переработке отходов деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной и гидролизной промышленности для получения спирта, белка, полупродуктов для фармацевтических и химических производств. Однако до настоящего времени не получены эффективные деструкторы лигнина хвойных пород деревьев, обладающие высокими скоростями роста, степенью утилизации и биотрансформации лигнина и его фрагментов. Поэтому выделение и селекция данных культур микроорганизмов являются достаточно актуальными с научной и практической точек зрения.

Выделение грибов-лигнолитиков проводили из обогащенных субстратов, являющихся естественными средами их обитания: лесные почвы, пораженная грибами древесина (ель, сосна), сточные воды очистных сооружений, а также гидролизный лигнин из отходов предприятия гидролизной промышленности (всего 37 образцов). В качестве селективных сред для отбора грибов-продуцентов лигнолитических ферментов использовали плотные питательные среды с минеральной основой среды Гетчинсона, содержащие гидролизный лигнин и феруловую кислоту (800 мг/л). Культивирование проводили при 25 °С в течение 3-10 сут.

В ходе работы было выделено 106 чистых грибных культур, способных с различной интенсивностью расти на средах, содержащих лигнин (35 культур) и феруловую кислоту (71 культура) в качестве источников углерода. На основании морфологических и физиологических признаков [1, 2] (в том числе результатов, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии) проведена предварительная идентификация выделенных культур. Выявлено, что большинство из них (91 культура) принадлежит к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Hyalobotrys*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Monocillium*, *Trichoderma*, *Phialophora* и *Fusarium*, а остальные – к дрожжам класса *Endomycetes*. Некоторые из выделенных микромицетов были идентифицированы как *Penicillium citreoviride* Biourge, *Phialophora repens* Davidson, *Trichoderma viride* Person ex Fries, *Penicillium citrinum* Thom, *Fusarium oxysporum* Snyder et Hansen, *Aspergillus niger* van Tieghem.

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВО-ВИТАМИННОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ *FUSARIUM SAMBUCINUM* И *MYCELIA STERILIA*

Супрун С. М., Харкевич Е. С. Донченко Г. В., Пархоменко, Кучмеровская Т. М
Институт биохимии имени А. В. Палладина НАНУ, Киев
Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАНУ, Киев

Грибы – ценный источник природных биологически активных веществ: незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, витаминоподобных веществ и других, многие из которых обладают свойствами антиоксидантов и антимуtagens. Тот факт, что грибной белок по своему аминокислотному составу не уступает белку животных, может являться основанием его использования для получения пищевых и кормовых добавок. Микроскопические грибы являются перспективными для использования в различных отраслях – защите окружающей среды, сельском хозяйстве, медицине. Целью данного исследования была разработка биотехнологии получения пищевой и кормовой добавки на основе совместного культивирования селекционированных штаммов микроскопических грибов – продуцентов витаминов, коферментов и белка. Были селекционированы штаммы - белково-витаминные продуценты. Основываясь на изучении особенностей биосинтеза витаминов селекционированных штаммов, их скорости роста, отсутствия антагонизма, нами отобраны культуры для совместного культивирования. На стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех» отработаны условия совместного культивирования *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 – продуцента комплекса витаминов и *Mycelia sterilia* ИМВ F-100014 – белково- ферментного продуцента с высоким содержанием лизина и триптофана. В результате культивирования этих штаммов содержание каждого из витаминов, в частности В₁, В₃, В₅, В₇ и β-каротина повысилось в 2-3 раза, увеличилось количество белка по сравнению с монокультурой, сроки ферментации сократились до 44-46 часов. Разработанная технология позволяет получать различные формы грибного препарата (порошкообразную, жидкую, гранулированную). Жидкая форма препарата может быть получена при термической обработке, гранулированная – при высушивании биомассы с использованием наполнителя. Полученный белково-витаминный продукт представляет собой комплекс природных биологически активных веществ (витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество витамина В₃ и его производных, в частности NAD⁺ (6,0 мг/г сухого веса), тиамин, витамина Е, витамина В₁₂, фолиевую кислоту и β-каротин. Испытание белково-витаминного продукта в опытах на животных имело положительный результат. Отмечено лечебно-профилактическое действие препарата, снижается заболеваемость ядерным полиэдрозом шелкопряда. Проведенные исследования позволили получить витаминно-белковый продукт, применение которого может повысить выживаемость животных, их физиологические и производственные показатели, а также способствовать повышению иммунитета живых организмов, что обосновывает его применение в качестве основы для получения лекарственных средств, как в медицине, так и сельском хозяйстве.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ МИКРО- И МАКРОМИЦЕТОВ НА ЕВРОПЕЙСКОМ СЕВЕРО-ВОСТОКЕ

Сысуев В. А., Широких И. Г., Широких А. А
ГНУ НИИ сельского хозяйства Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого
Россельхозакадемии, Киров

Значительная площадь европейского Северо-Востока занята лесной растительностью. Лесные экосистемы образуют два важнейших компонента – фитоценозы и микоценозы. Вопросы изучения и сохранения грибного разнообразия приобрели в последнее время большое значение в связи с продолжающимся сокращением общего биоразнообразия лесных экосистем. Происходит сокращение площадей высокопродуктивных угодий, снижается величина биологического запаса грибного сырья вследствие возрастания эксплуатационной нагрузки на популяции съедобных и лекарственных видов грибов. В сложившейся ситуации насущной проблемой становится не только организация мониторинга за состоянием грибных ресурсов и их рациональным использованием, но и вопросы сохранения природного разнообразия грибов.

В настоящее время наряду с традиционными способами охраны грибов в природе (*in situ*) как весьма перспективный подход микологами рассматривается сохранение и поддержание генетических ресурсов грибов в коллекциях *ex situ*. Создание микологических коллекций даёт возможность не только сохранять генофонд экономически значимых видов, но и использовать его для решения многих вопросов фундаментальной и прикладной науки.

В рамках комплексных исследований ГНУ НИИ сельского хозяйства Северо-Востока проводится изучение разнообразия и структуры комплексов почвенных микромицетов в агроценозах подзоны южной и средней тайги европейской части России. Собранный в процессе обследования агроценозов Кировской области коллекция микромицетов включает около 90 штаммов из родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Acremonium* с разнообразными свойствами. Изучается антагонистическая активность культур микромицетов в отношении штаммов фитопатогенных грибов для создания препаратов для биологической защиты растений.

В результате совместной Китайско-Российской микологической экспедиции, проведённой летом 2006 года в подзоне южной тайги Кировской области, положено начало формированию регионального гербария и коллекции культур макромицетов. Таксономический состав гербарных образцов коллекции включает в настоящее время 91 вид грибов, относящихся к 53 родам из 22 семейств и 12 порядков. Основной фон макромицетов в лесах центральной части области составляют базидиальные макромицеты. Преобладают в гербарной коллекции представители порядков Agaricales (34 вида), Russulales (15 видов), Boletales (12 видов) и Poriales (11 видов). Среди семейств лучше всего представлено Tricholomataceae (17 видов) и Russulaceae (15 видов). Из числа родов больше всего видов выявлено для *Russula* (10 видов) и *Amanita* (6 видов). На растениях и гниющих органических остатках, впервые для Кировской области, обнаружены 6 видов миксомицетов: *Fuligo septica*, *Fuligo sp.*, *Dacrymyces palmatus*, *Lycogala epidendrum*, *Leocarpus sp.*, *Stemonitis splendens*.

В ходе рекогносцировочных исследований микобиоты Государственного природного заповедника «Нургуш» в 2009 году были выявлены ещё 16 видов миксомицетов, относящихся к 4 порядкам и 6 семействам: Trichiaceae, Physaraceae, Reticulariaceae, Didymiaceae, Ceratiomucoceae, Stemonitaceae.

Получены мицелиальные культуры ряда базидиальных макромицетов. Проводится изучение биологических свойств отдельных штаммов и разработка способов их искусственного культивирования, что могло бы полностью устранить опасность истощения естественных запасов грибов. Формируемая коллекция явится фондом научных данных о физиолого-биохимических свойствах всех имеющихся в ней культур грибов и источником для скрининга штаммов, ценных в разработке новых биотехнологий.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПУТЕМ БИОСИНТЕЗА НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, ОСНОВАННЫХ НА ОТХОДЕ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА БАРДЕ

Тихонова О. В.¹, Платунов А. В.¹, Толстихина Т. Н.¹, Ибрагимова С. И.², Толстых И. В.¹, Ефременкова О. В.¹

¹Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

²Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

В биотехнологии большое значение имеет разработка способов получения антибиотиков и других биологически активных веществ методом биосинтеза. Вместе с тем, актуальной проблемой является утилизация промышленных отходов, в частности, отхода промышленного производства этилового спирта – барды. Нами разработан способ получения биологически активных веществ, в котором основой питательных сред для биосинтеза является барда, таким образом, решаются сразу две указанные задачи.

При производстве 1 л этилового спирта образуется 10–12 л барды, причем в России суммарное количество вырабатываемой барды составляет более 10 млн т в год. Часть барды, содержащей большое количество питательных веществ, утилизируется путем упаривания (что требует больших затрат электроэнергии), а сухой остаток используется в кормопроизводстве. Существенная часть барды, несмотря на наличие в ней большого количества питательных веществ, в дальнейшем не используется и сбрасывается на поля и в водоемы. В результате на поверхности земли образуется кислая неутрачиваемая гелеобразная пленка, загрязняется почва, нарушаются биоценозы водоемов. Слив барды в канализацию невозможен из-за больших объемов и высокого содержания в ней органических веществ.

Поскольку в состав барды входят белки, аминокислоты, сахара, витамины, микроэлементы и вода, ее можно использовать в качестве основы для питательных сред при производстве биологически активных веществ, например, антибиотиков и ферментов. Нами разработаны способы получения некоторых антибиотиков, образуемых грибными штаммами-продуцентами, например лагоподина В, обладающего активностью в отношении метициллин-устойчивых штаммов золотистого стафилококка (MRSA), иллудинов М и S, обладающих противоопухолевой активностью, антибактериальных антибиотиков бензилпенициллина и феноксиметилпенициллина, а также других биологически активных веществ, например биологически активной добавки к пище «ОВО-Д», обладающей иммуностимулирующим действием, и ряда ферментов.

В качестве посевных и ферментационных питательных сред для глубинного культивирования грибов-продуцентов (*Coprinus radiatus* штамм 2987ОЕ, *Omphalotus olearius* штамм 3500ОЕ, *Penicillium chrysogenum* штамм 339А,

Pleurotus ostreatus штамм 1137) использовали барду или ее фильтрат в качестве единственного источника питательных веществ, либо совместно с другими компонентами. На данных средах был достигнут уровень антибиотической активности, сопоставимый с уровнем, полученным на традиционных питательных средах, включающих дорогостоящие компоненты, в том числе очищенную воду.

Таким образом, на примере продуцентов ряда антибиотиков показано, что настоящая разработка позволяет решить как экологическую проблему – утилизацию больших объемов барды, – так и существенно снизить себестоимость процесса производства антибиотиков и других биологически активных веществ за счет значительного сокращения использования или полного исключения дорогостоящих компонентов из питательных сред.

АНТИМИКРОБНАЯ И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *LENTINUS EDODES* И *GANODERMA LUCIDUM*.

**Тренин А. С., Цвигун Е. А., Соболева Н. Ю., Автономова А. В., Краснопольская Л. М.
НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАН, Москва**

Комплексное изучение разнообразных свойств микробных продуцентов позволяет отбирать штаммы базидиомицетов, способные к продукции сразу нескольких биологически активных веществ, характерных для всего вида в целом. Обнаружение штаммов, обладающих разнообразными потенциями, открывает новые перспективы в использовании культур, может существенно повысить эффективность работы с выделенными штаммами, способствовать созданию новых более эргономичных технологий получения медицинских препаратов.

Проведенное нами комплексное изучение свойств культур базидиальных грибов двух видов - *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum* - позволило отобрать штаммы, способные к продукции сразу нескольких биологически активных веществ. Наряду с образованием метаболитов с противоопухолевыми свойствами и ряда антибиотических веществ [Соболева и др., 2006, Бухман и др., 2007], такие штаммы оказались способными к продукции вторичных метаболитов – ингибиторов биосинтеза стеролов.

Выявление гиполипидемической активности проводилось в экспериментах с использованием бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *H. halobium*). Тест основан на использовании микробной культуры, синтезирующей стерольную основу своих мембран по мевалонатному пути биосинтеза, аналогичному пути биосинтеза холестерина в организме млекопитающих.

Способность к подавлению биосинтеза стеролов выявлена у препаратов, полученных из культуральной жидкости и мицелия отдельных штаммов *L. edodes*, а также культуральной жидкости отдельных штаммов *G. lucidum*. Препараты биологически активных веществ получали путем экстракции из культуральной жидкости этилацетатом, а также экстракцией ацетоном или этанолом из мицелия продуцентов.

Внесение испытуемых препаратов в среду культивирования *H. salinarum* приводило к подавлению роста тест-культуры. Добавление экзогенной мевалоновой кислоты позволяло снимать подавляющее действие испытуемых препаратов (этилацетатный экстракт культуральной жидкости штамма 15 *L. edodes*, а также экстракт мицелия при кислых значениях pH), что свидетельствует о способности указанных препаратов к подавлению начальных стадий биосинтеза стеролов, предшествующих образованию мевалоната.

БИОСИНТЕЗ КОМПОНЕНТОВ МИКРОБНОГО ФАКТОРА АВТОЛИЗА КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ ТРИПТОФАНА ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ БАЗИДИОМИЦЕТА *LENTINUS EDODES*

Цивилева О. М.¹, Учаева И. М.², Андреев К. В.², Лощинина Е. А.¹, Панкратов А. Н.³, Дербенева В. В.³, Никитина В. Е.¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский государственный технический университет

³Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Настоящая работа представляет собой фрагмент научных исследований с целью обнаружения биосинтеза свободных жирных кислот и выявления возможности их отнесения к числу компонентов микробного фактора автолиза клеток при глубинном культивировании гриба *Lentinus edodes* (шиитакэ).

Синтезируемый микроорганизмами в процессе развития и выделяемый в культуральную жидкость ауторегуляторный фактор d_2 жирнокислотной природы является мембранотропным метаболитом, аутостимулятором автолиза. В малых концентрациях он активизирует, а в высоких ингибирует дыхание клеток и вызывает их автолиз. Физиологическое действие фактора d_2 обусловлено влиянием фракции свободных жирных кислот, содержащей в основном пальмитиновую, стеариновую и олеиновую кислоты. Сравнение физиологической активности этих кислот показывает, что наибольшим эффектом обладает олеиновая кислота.

Поставлена задача установления закономерностей в изменении состояния культуры в зависимости от уровня экзогенного *L*-триптофана (Trp) с целью подтверждения предположений о его индуцирующей роли (или индифферентного отно-

шения) в биосинтезе фактора d_2 в культуре шиитаке. Исследованию были подвергнуты образцы культуральной жидкости шиитаке, полученные путем добавления Trp к исходной питательной среде. Концентрация Trp в растворах составляла 0.01 и 0.1 г/л; образец для контроля - без Trp. Анализ продуктов биосинтеза в воздушно-сухих пробах выполняли газожидкостно-хроматографическим методом путем предварительной дериватизации (силилирование действием реагента N, O-бис(триметилсилил)-трифторацетида) (БСТФА), дальнейшего разделения полученной смеси в газожидкостном хроматографе HP 7890A на капиллярной колонке с масс-селективным детектированием (детектор 5975C). Колонка HP 5 MS, длина колонки 25 м. Для автоматизации хроматографического анализа применялся программно-аппаратный комплекс "ChemStation".

Хроматограммы экстрактов образцов культуральной жидкости характеризуются наличием пиков, среди которых четко прослеживается присутствие триметилсилиловых эфиров жирных кислот в виде соответствующих молекулярных и осколочных ионов. Исключением является тетрадекановая кислота, содержание которой либо не изменяется, либо незначительно уменьшается с течением времени. В экстрактах культуральной жидкости детектируется олеиновая кислота. Содержание тетра-, гекса- и октадекановой кислот циклично изменяется по истечении 7, 14, 21 суток. Концентрация олеиновой кислоты постоянно растет в присутствии Trp, при этом в контрольном опыте это увеличение наблюдается после 14 сут, а в пробах с Trp уже через 7 сут. Таким образом, присутствие экзогенного триптофана в глубинной культуре шиитаке приводит к ответной реакции, затрагивающей изменения тех жирнокислотных компонентов мицелия и культуральной жидкости гриба, которые входят в состав биохимического фактора d_2 - аутоstimулятора автолиза.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА *ASPERGILLUS PARVULUS* SMITH

Цыганенко Е. С.

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

В современной органической химии быстрыми темпами развивается отрасль изучения продуктов биосинтеза физиологически активных веществ разными организмами. Техническое развитие сегодня получили методы выделения и идентификации природных метаболитов, существенную долю которых составляют антибиотики, гербициды, микотоксины и фитотоксины, продуцируемые микроскопическими грибами.

Ранее в нашей лаборатории был проведен скрининг около 200 штаммов микромицетов, выделенных из экзотических ниш обитания, на предмет выявления биологически активных метаболитов с целью их дальнейшего практического применения. Из всех исследованных грибов, был отобран один из штаммов *A. parvulus*, метаболит(ы) которого имеет широкий спектр антибиотического действия и высокую фитотоксическую активность, а также ингибирует прорастание семян растений, принадлежащих к семействам злаковых, бобовых и тыквенных.

Целью исследования было выделение в кристаллическом виде и очистка биологически активного метаболита *A. parvulus*.

На 8 сутки культивирования микромицета собирали культуральную жидкость и отфильтровывали при помощи вакуум-фильтра. Попытка сконцентрировать полученный фильтрат методом диализа с полиэтиленгликолем-6000 показала факт потери активного вещества, из чего можно сделать вывод об его небольшой молекулярной массе. В дальнейшем фильтрат упаривали под пониженным давлением до маслянистой консистенции и фракционировали при помощи колоночной хроматографии, где как стационарная фаза использовался оксид алюминия (2-ой степени активности по Брокману), элюировали 0, 1 н раствором соляной кислоты.

Выход фракций контролировали по антибиотической активности относительно *B. subtilis* и по тонкослойной хроматографии в системе муравьиная кислота : вода (1 : 1). Визуализацию пятен на хроматограммах проводили в парах йода. Полученные активные фракции объединяли и определяли их минимальную подавляющую концентрацию (МПК). МПК активной фракции равнялась 2 мг/мл, а хроматография выявила наличие примесей, в т. ч. и пигментных.

На втором этапе колоночной хроматографии как стационарную фазу использовали сорбент Toyopearl HW-40, элюировали дистиллированной водой. Полученные антибиотически активные фракции объединяли и упаривали под пониженным давлением. Методом кристаллизации из смеси метанол : n-гексан были получены пластинчатые кристаллы, МПК которых равнялась 0, 14 мг/мл. Значение МПК позволило нам сделать вывод о том, что после второго этапа колоночной хроматографии степень очистки полученного конечного препарата была повышена в 14 раз.

Чистоту полученных кристаллов подтверждали также данными тонкослойной хроматографии в трех разных системах растворителей: бутанол, насыщенный водой; муравьиная кислота : вода (1 : 1); этанол : вода (1 : 1). При визуализации активного вещества и при биоавтографии было обнаружено одно пятно, что дает право определять полученные кристаллы как препарат высокой степени очистки.

Следует отметить, что использование двухступенчатой колоночной хроматографии с двумя разными системами стационарная фаза-элюент для выделения и очистки антибиотических веществ является новым подходом, т. к. ранее для этой цели использовали исключительно одноступенчатую хроматографию с определенной стационарной фазой и набором органических растворителей для элюирования. Также следует отметить, что все условия выделения, очистки и хроматографии препарата были отработаны нами в предыдущих опытах в нашей лаборатории.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДОВ ВЫСШИХ ГРИБОВ И ПРОМЫШЛЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

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

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Биологическое действие препаратов на основе грибов в немалой степени определяется входящими в их состав соединениями липидной природы. Физико-химические методы изучения свойств масел и жиров, определяющие их качество, представлены в ГОСТах пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Сложность состава природных липидов грибов требует сочетания нескольких методов исследования. Поэтому представляло интерес сравнение физико-химических характеристик липидов грибов *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus* и *Cordyceps militaris* с соответствующими характеристиками промышленных масел и жиров.

Физическо-химические свойства жиров зависят от содержащихся в них жирных кислот. Числа омыления и Рейхерта-Мейссля в грибных липидах во много раз превышают таковые у промышленных растительных масел, а средняя молекулярная масса жирных кислот у них более низкая. Это указывает на наличие в липидах грибов большого количества низкомолекулярных короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК). Особенно много КЦЖК содержится в липидах гриба *L. sulphureus*.

Продукты, содержащие КЦЖК, с успехом используются в функциональном питании практически здоровых людей и пациентов с различными патологиями: кожи и внутренних органов, сердечно-сосудистой системы, ожирением, сахарным диабетом 2-го типа, нарушениями функций иммунной системы, дисбактериозе, аллергиях, в акушерско-гинекологической практике.

Качественный состав липидов определяет не только их химические, но и физические свойства. В зависимости от содержания непредельных жирных кислот меняется консистенция растительных масел и температура их застывания: у жидких масел, содержащих больше непредельных жирных кислот, температура застывания обычно ниже нуля, у твердых жиров, содержащих больше насыщенных – достигает 40 °С. Качество промышленных масел определяется перекисным, йодным, родановым числами, которые и у грибных липидов также соответствуют ГОСТу. Несмотря на то, что качественный и количественный состав жирных кислот грибных липидов близок к таковому у растительных пищевых масел, температура плавления и застывания липидов жиров напрямую не зависит от ненасыщенности жирных кислот, входящих в их состав. На основании температуры плавления и застывания липиды грибов *L. sulphureus* и *G. lucidum* могут быть отнесены к твердым, липиды *C. militaris* – к жидким. Это можно объяснить тем, что очищенные масла в основном состоят из триглицеридов (94–96%), в то время как в составе грибных липидов содержание триглицеридов не превышает 30% от общих липидов и сравнимо с содержанием в них фосфолипидов – от 25 до 40%, в них много стероидных соединений, восков, гликолипидов, пигментов и витаминов липофильной природы. Гетерогенный состав нативных грибных липидов подтверждается и повышенным по сравнению с растительными промышленными маслами массовым числом веществ, нерастворимых в эфире.

Полученные результаты подтверждают высокую биологическую ценность липидной компоненты исследуемых грибов и определяют перспективность разрабатываемых функционально-корректирующих препаратов на основе базидиальных грибов.

СРАВНЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ КЕТОКАРОТИНОИДОВ ГРИБА LAETIPORUS SULFUREUS ПРИ ХРАНЕНИИ СУХОГО МИЦЕЛИЯ И ЭКСТРАКТОВ

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

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Известно наиболее активные биоантиоксиданты липидной природы, такие как каротиноиды и полиненасыщенные жирные кислоты, под действием света, кислорода воздуха, иницирующих соединений самой субстанции вступают в цепные реакции окисления с образованием свободных радикалов. Поэтому при создании функционально-корректирующих препаратов на основе мицелия гриба *Laetiporus sulphureus*, содержащих данные природные антиоксиданты, важно стабилизировать их содержание при хранении в течение достаточно длительного времени. Если в свежей биомассе гриба *L. sulphureus*, может содержаться до 160–180 мг/% кетокаротиноидных пигментов, то после высушивания в токе теплого воздуха при 60 °С их содержание не превышает 90–100 мг/%, а при хранении в течении 6 месяцев без внесения экзогенных ингибиторов окисления – падает до 20–25 мг/%. Природные биоантиоксиданты липидной природы могут обладать двойственным действием, при определенных концентрациях проявляя максимумом антиоксидантной активности (АОА), а при изменении этой концентрации может отмечаться ослабление антиоксидантных свойств вплоть до проявления прооксидантных. Этим процессом самоиндукции окисления можно объяснить больший процент потерь (до 45%) кетокаротиноидов в биомассе с изначально высоким содержанием каротиноидов 160–180 мг/% по сравнению с партией, где содержание их было ниже 70–80 мг/% (до 20% потерь). Исследовано влияние различных антиоксидантов-стабилизаторов на сохранность каротиноидов в субстанции. Внесение антиоксидантных композиций в концентрации,

используемых в пищевой промышленности (№ 109 – бутилоксианизол-10%, ионол-10%, пропилгаллат-6%, лимонная кислота-6%, моно- и диглицериды жирных кислот-68%; № 1021 – аскорбилпальмитат-20%, натуральные токоферолы-10%, эфиры лимонной кислоты и моно- диглицериды жирных кислот-70%; №204 – трет-бутилгидрохинон-20%, лимонная кислота-10%, пропиленгликоль-70%), не оказало существенного влияния на сохранность каротиноидных пигментов мицелия. Для предотвращения окисления в сухой биомассе гриба использовали ионол (2, 6 – ди – трет – бутил – 4 – метилфенол) и аскорбиновую кислоту в различных концентрациях. При хранении в течение длительного времени (до 18 месяцев) сухого каротинсодержащего мицелия при t от +5°C до 0°C лучшим стабилизатором процессов окисления у кетокаротиноидных пигментов оказался водный раствор аскорбиновой кислоты 10^{-1} М и ионол 0, 5%. Аналогичные концентрации аскорбиновой кислоты и ионола были использованы и при изучении стабильности кетокаротиноидных пигментов и в спиртовых экстрактах. Показано, что при хранении спиртовых экстрактов с аскорбиновой кислотой 10^{-1} М и 10^{-3} (t от +5°C до 0°C) в течение полугодия содержание каротиноидов практически не изменялось, а к 9 месяцам потери каротиноидов были минимальны – около 20%. Для сравнения, при внесении вышеуказанных экзогенных стабилизаторов в сухую биомассу после 9 месяцев хранения потери кетокаротиноидных пигментов составляли около 50%, а в контроле достигали – 70-80%. Действие ионола было одинаково и на сухой каротинсодержащий мицелий и на каротинсодержащие спиртовые экстракты. Данный АОА в течение полугодия сдерживал окисление каротиноидов на уровне 50%, в сравнении с контролем – 70%, а к 9 месяцам процент потерь пигмента составлял около 80%, как при хранении с ионолом так и в контроле. Таким образом нами показано, что лучшим стабилизатором кетокаротиноидов гриба *Laetiporus sulphureus* как в сухом мицелии, так и в спиртовых экстрактах является аскорбиновая кислота 10^{-1} М, причем в экстрактах удается гораздо лучше стабилизировать процессы окисления кетокаротиноидов.

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ГРИБОВ ИЗ РОДА TRAMETES И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВЕТЕРИНАРИИ

Чхенкели В. А., Горяева Н. А., Мартынова А. Ю., Чхенкели Л. Г., Алексеев М. И., Барыкина Т. И.

Иркутский филиал ИЭВ Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии, Иркутский государственный медицинский университет Росздрава, ГУП «ОПХ Байкало-Сибирское» СО Россельхозакадемии, Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория

Колибактериоз наносит значительный экономический ущерб хозяйствам. Лечение молодняка антибиотиками, сульфаниламидными препаратами, нитрофуранами не всегда даёт положительные результаты.

В ИФ ГНУ ИЭФС и ДВ разработан препарат Леван – 2, получаемый с использованием современных методов биотехнологии на основе базидиомицета *Trametes pubescences* (Shumach. : Fr.) Pilat. штамм 0663. Ранее было показано, что препарат обладает противовоспалительным, антимикробным, иммуностимулирующим и противотуберкулёзным действием. Особый же интерес представляет его высокая активность в отношении бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Цель настоящей работы заключалась в разработке схемы лечения колибактериоза телят с применением препарата Леван – 2 в условиях хозяйства. Изучение лечебной эффективности препарата проводили на базе МТФ ГУП «ОПХ Байкало-Сибирское». При бактериологическом исследовании материала от павших животных общепринятыми методами были выявлены возбудители колибактериоза *Escherichia coli* серотипов O₉ и O₂₆, а так же серотипа O157:H7 – патогенного для человека. Было сформировано 4 опытных и 2 контрольных группы по 5 – 6 телят чёрно – пёстрой породы 15 – 25 – дневного возраста. В качестве препарата сравнения использовали препарат фуросин. В трёх опытных группах с лечебной целью Леван – 2 выпаивали с молоком один раз в сутки в дозах 10, 20, 25 мл на 10 кг живой массы. Животные четвёртой опытной группы получали фуросин с молоком в дозе 12 г на 10 кг живой массы. Критерием оценки лечебной эффективности препаратов служили результаты клинических, гематологических и биохимических исследований. Клиническое наблюдение за физиологическим состоянием телят проводили в течение 10 – 14 сут., регистрируя температуру тела, общее состояние, пульс, дыхание, подвижность, наличие диареи, течение и исход заболевания. Гематологические исследования проводились на автоматическом анализаторе «Abacus Junior» (Diatron, Австрия) по 18 параметрам, включая дифференцировку лейкоцитов, биохимические исследования – на автоматическом анализаторе «BS 3000 P» (Mindrey, Китай). При использовании препарата Леван – 2 наблюдали не только изменение клинической картины с резкой положительной динамикой, но и улучшение общего состояния животных. Дальнейшее наблюдение за животными, получавшими препарат Леван – 2 показало, что они не только догоняли телят из контрольной группы по весу, но и опережали, а также обладали более высокой устойчивостью к другим заболеваниям. По результатам гематологических исследований установлено, что при лечении Леваном – 2 количество эритроцитов увеличилось на 6, 1% и снизилось на 5, 7 % при лечении фуросином; количество лейкоцитов снизилось на 13, 3 % и незначительно увеличилось при применении фуросина; содержание гемоглобина повысилось на 10, 9 на 11, 9 %, соответственно; количество общего белка в сыворотке крови увеличилось на 2, 5 % и практически не изменилось при лечении фуросином. Аналогичные результаты были получены ранее при проведении испытаний пре-

парата Леван-2 на МТФ ЗАО «Хомутовское» Иркутского района. При лечении Леваном -2 выздоровление телят наблюдали через 4-5 дней, при лечении фуруксином - через 6-7 дней. Таким образом, установлено, что эффективность лечения колибактериоза телят препаратом Леван-2 в 1,5 раза выше, чем при лечении фуруксином, сроки выздоровления животных сокращаются на 28,6%, а затраты на лечение снижаются в 6 раз.

РОЛЬ КСИЛОТРФНЫХ БАЗИДОМИЦЕТОВ В КОМПЛЕКСНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ РЕСУРСОВ

Шахсеванимуджарад Л.А., Гасымов Ш.Н., Аттаргусейни М.Ю., Мурадов П.З., Алиева В.Дж.
Институт Микробиологии НАН Азербайджана, Баку
Центральный ботанический сад НАН Азербайджана, Баку

В связи с образованием предельно большого количества растительных отходов, разработка наиболее эффективных методов утилизации отходов становится необходимой, с одной стороны - с целью охраны окружающей среды, с другой - для расширения сырьевой базы и удовлетворения потребности населения мира к продуктам разного назначения, что и явилось целью данной работы.

Эксперименты проводились в различных направлениях, первый из которых заключался в прямой конверсии растительных материалов, с целью получения обогащенного белком и другими физиологически активными веществами продукта кормового, пищевого и лечебного назначения. В результате было отобраны штаммы грибов *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, которые имели определенную перспективу для дальнейших исследований.

Изучение химического состава биомассы, полученной в результате микробиологической конверсии отходов аграрного сектора грибом *B. adusta*, показало, что она является продуктом, не обладающим токсичностью, обогащенной белком, витаминами и др. биологически активными веществами и имеет высокую переваримость. Этот продукт в качестве кормовой добавки был испытан в промышленных условиях и получен положительный результат.

Установлено, что при выращивании гриба *P. ostreatus* на растительных отходах интенсивным способом, можно получить ценный пищевой продукт (плодовое тело), а субстрат, оставшийся после культивирования можно использовать в качестве субстрата для выращивания субтропических и тропических растений, таких как *Aglonema commutatum*, *Anthurium scherzerianum*, *Begonia rex*, *Billbergia nutans*, *Clivia miniata*, *Dieffenbachia maculate*, *Ficus benjamina*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Monstera deliciosa* и *Scindapsus pictus*, используемых для оздоровления экологии закрытых помещений. Результаты показали, что остаточный субстрат полностью не может заменить субстрат, как правило, используемый для данной цели. Однако использование отходов в смешанном с субстратом виде, дал положительный результат. Например, при добавлении в основной субстрат до 30% отходов, месячный прирост растений составлял 3, 8-5, 9 см (в контроле 3, 1-5, 2 см), а период цветения 20-52(15-45) суток. Кроме того, было установлено, что при использовании остаточного субстрата для этих целей, способствует уменьшению (до 25-30%) болезней, вызываемых патогенными грибами на этих растениях.

Биомасса, полученная путем конверсии отходов грибом *G. lucidum*, содержала белки, витамины, липиды, различные гидролитические ферменты, полисахариды и др. физиологически активные вещества. Полученный продукт в виде порошка был добавлен в рацион несущих и бройлерных птиц, в результате которого в обоих случаях получен положительный результат. С другой стороны, биохимический состав полученных продуктов (мясо и яйцо) также показали о целесообразности использования данных продуктов для таких целей.

Таким образом, в результате проведенных исследований на примере макромицетов, была разработана малоотходная комплексная технология (или же безотходная для определенного этапа) биоконверсии растительного сырья, предусматривающая рациональное использование растительных ресурсов.

О ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ МИКРОМИЦЕТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

Шейна Н. И.¹, Буданова Е. В.²

¹ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, ММА имени Сеченова, Москва

Биотехнологическая промышленность на основе управления жизнедеятельностью микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, грибы) получает огромный ассортимент продукции, используемый в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой и химической промышленности.

Среди микромицетов в биотехнологиях широко используются представители родов *Candida*, *Endomycopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusidium*. Они являются продуцентами антибиотиков, ферментов, органических и неорганических кислот, кормовых белков, входят в состав биологических средств защиты растений, инсектицидов, используются в оздоровлении окружающей среды, в частности, с их помощью проводят очистку почвы, водоемов и воздушной среды от загрязняющих веществ.

Однако биотехнологические процессы как любая промышленная деятельность человека является источником загрязнения окружающей среды. Результаты гигиенических и токсикологических исследований промышленных микроорганизмов, начатые примерно в середине прошлого века, свидетельствуют об их выраженном вредном влиянии на здоровье человека и окружающую среду.

Специфические нарушения здоровья работающих в микробиологической промышленности и населения сельских зон наблюдаются в виде перестройки иммунобиологической реактивности организма с признаками аллергического повреждения респираторных органов, кожных покровов, желудочно-кишечного тракта, дисбактериозов кишечника. Поэтому задачей профилактической медицины является оценка токсичности и опасности биотехнологических штаммов микромицетов с целью ограничения их содержания в объектах окружающей среды (воздух, вода, почва).

В настоящее время разработана принципиальная схема проведения токсиколого-гигиенических исследований новых биотехнологических штаммов. Интегральной величиной, характеризующей степень опасности биологического фактора в отношении здоровья человека, является величина гигиенического регламента – предельно допустимая концентрация (ПДК).

Токсиколого-гигиеническую оценку и санитарную стандартизацию промышленных микроорганизмов производят по трем основным этапам. Первый этап исследования включает в себя сбор информации об интересующем исследователя микроорганизме и первичную токсикологическую оценку (исследование патогенных свойств). Результатом является решение вопроса о возможности использования его в биотехнологиях. Второй этап предусматривает полную токсикологическую оценку с последующим экспериментальным обоснованием норматива (ПДК в атмосферном воздухе и воздухе рабочей зоны). На третьем этапе проводят клинико-гигиенические исследования с целью корректировки экспериментально установленных ПДК.

Показано, что основными проявлениями вредного действия микромицетов, используемых в биотехнологиях, являются иммунотропный и дисбиотический эффекты, проявление которых зависит от таксономической характеристики биотехнологических штаммов, а выраженность эффектов – от воздействующей концентрации/дозы. Длительное воздействие большинства штаммов грибов приводит к изменению баланса иммунокомпетентных клеток, эозинофилии в крови и сенсибилизации экспериментальных животных. Дисбаланс микроэкологии кишечника выражается в изменении концентрации и частоты высеваемости *E. coli* и других представителей условно-патогенной микрофлоры, а также в снижении содержания бифидобактерий и лактобацилл.

В результате многосторонних исследований в настоящее время установлено около 70 ПДК микромицетов и препаратов на их основе в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест. Создан информационный банк данных по оценке их токсичности и опасности, разработана классификация по степени опасности и усовершенствована программа их токсиколого-гигиенической оценки.

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TRICHODERMA* ПРИ СТАТИЧЕСКОМ И ДИНАМИЧЕСКОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Шутова В. В., Чалганова Т. А.

Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск

Растительная целлюлозосодержащая биомасса – это наиболее распространенный в мире возобновляемый источник углерода, который можно использовать для получения широкого круга веществ. Осахаривание целлюлозы с помощью ферментов целлюлаз – важнейшая стадия таких процессов. Основными микроорганизмами, продуцирующими целлюлазы, являются грибы – возбудители мягкой, белой и бурой гнили, а также различные виды аэробных и анаэробных бактерий. Наиболее распространенным и активным продуцентом целлюлаз как в России, так и за рубежом являются грибы рода *Trichoderma*. Налажено промышленное производство ферментных препаратов из различных штаммов *Trichoderma reesei* и *Tr. longibrachiatum*, которые также можно использовать при обработке целлюлозосодержащего сырья.

Целью данной работы являлось изучение целлюлазной активности микромицетов рода *Trichoderma* при статическом и динамическом культивировании.

В настоящее время многие работы указывают на участие в разложении древесины таких микромицетов, как *Tr. asperellum*, *Tr. longibrachiatum*, *Tr. viride* и *Tr. harzianum*. Культивирование этих грибов проводили в статических и динамических (150 об/мин) условиях, используя селективную среду с микрокристаллической целлюлозой.

В процессе культивирования отмечено увеличение вязкости среды, которая оставалась мутной. Исследуемые штаммы в динамических условиях росли в виде мицелиальных агломератов, в статических – в виде очень мелких отдельных гиф мицелия, которые развивались во всем объеме среды.

В статических условиях содержание белка увеличивалось в течение всего исследованного времени роста, в динамических – у всех культур был четко выраженный максимум на 2 или 3 сутки.

Целлюлолитическая активность *Tr. longibrachiatum* в статических условиях достигала максимума на 2 сутки, затем уменьшалась. Она превышала значения активности в динамических условиях почти в 2 раза. В этом случае удельная активность равна 481 ед/мг.

У *Tr. asperellum* активность эндоцеллюлазы падала после 1 суток. Максимальное значение в статических условиях было в 1, 2 раза больше по сравнению с динамическими. В статических условиях целлюлолитическая активность, начиная с 1 суток, падала незначительно. Удельная активность без перемешивания составила 751 ед/мг.

Максимумы активности целлюлаз *Tr. viride* были примерно одинаковыми и в статических условиях, и при перемешивании, однако во втором случае наблюдалось резкое падение данного показателя уже на 2 сутки культивирования.

Такая же тенденция отмечена и у микромицета *Tr. harzianum*. Здесь наивысшая целлюлолитическая активность была при росте на качалке.

Можно отметить, что у гриба *Trichoderma asperellum* наивысшие концентрация белка и целлюлолитическая активность были, соответственно, в 1, 3 и 1, 2 раза больше, чем у гриба *Trichoderma longibrachiatum*.

По абсолютным значениям наивысший показатель зафиксирован у *Tr. viride* и *Tr. harzianum*, самое низкое значение показал *Tr. longibrachiatum*.

ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ ПОГРУЖЕННОГО МИЦЕЛИЯ *GANODERMA LUCIDUM* И *FLAMMULINA VELUTIPES* ИНДУЦИРУЮТ ИНТЕРФЕРОН В КУЛЬТУРЕ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, НО РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ТИПУ ПРОДУЦИРУЕМОГО ИНТЕРФЕРОНА.

Щегловитова¹ О. Н., Бабаянц¹ А. А., Склянкина¹ Н. Н., Болдырева¹ Н. А., М. И. Лентьева², А. В. Автономова², Краснопольская² Л. М.

¹ - НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва

² - НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

Известно, что препараты, выделенные из базидиальных грибов *Ganoderma lucidum* (Curt. :Fr.) P. Karst. и *Flammulina velutipes* (Curt. :Fr.) Singer, обладают важными лечебными свойствами, выявленными при работе на экспериментальных моделях: они способны оказывать антиопухолевый и анти-метастатический эффект, действовать синергично с интерфероном в антивирусном действии, направленном против вируса гепатита В. Эти эффекты *G. lucidum* и *F. velutipes* могли быть связаны с индуцируемым ими интерфероном, иммуномодулирующим и активирующим цитотоксичность специфических цитотоксических Т клеток действием препаратов. Препараты GL50 и FV 42, выделенные из погруженного мицелия *G. lucidum* и *F. velutipes*, соответственно, по химическому составу представляют водорастворимые полисахариды. Они оказали достоверный противоопухолевый эффект на моделях перевиваемых мышинных опухолей в системе *in vivo* (Бухман и др., 2007, Краснопольская и др., 2008). Одним из механизмов их действия могла быть способность индуцировать интерферон в организме. Поэтому представляло интерес исследовать интерферониндуцирующую способность этих препаратов и кроме этого определить тип продуцируемого интерферона.

Для решения этой задачи использовали лейкоциты крови доноров и два метода тестирования интерферона: биологический и метод иммуноферментного анализа (ИФА). В лейкоциты крови вносили препараты в разных концентрациях и через 24, 48 и 72 часа культивирования при 37° отбирали пробы культуральной среды, которые хранили при -20° до тестирования. Биологическим методом интерферон тестировали в культуре диплоидных фибробластов человека по торможению развития цитопатического действия 100 доз индикаторного вируса. Для метода ИФА использовали тест-системы фирмы «Вектор-Бест».

В результате выполнения исследования удалось выяснить, что препарат GL50 в концентрациях от 0, 01 мг/мл до 100 мг/мл индуцирует в лейкоцитах человека продукцию интерферона. Наибольшая активность интерферона составляла 32-128 ед/мл и выявлялась при использовании препарата в концентрации 0, 2-100 мг/мл. Оптимальное время для выявления наибольшего титра интерферона составляло 72 часа. Препарат FV 42 индуцировал в лейкоцитах человека продукцию интерферона в концентрации от 0, 0001 мг/мл до 5 мг/мл. Наибольшая активность интерферона составляла 16-32 ед/мл и выявлялась при использовании препарата в концентрации 0, 005-0, 1 мг/мл. Оптимальное время для выявления наибольшего титра интерферона составляло 48 часов. Тестирование образцов интерферона, индуцированного препаратами в лейкоцитах крови, методом ИФА показало, что препарат GL50 вызывает образование интерферона типа гамма, тогда как интерферон, образуемый под влиянием препарата FV 42, гамма интерфероном не является.

Следовательно, препараты GL50 и FV42 обладают способностью индуцировать интерферон в лейкоцитах крови человека и поэтому могут обладать антивирусной и иммуномодулирующей активностью. Возможно, именно со способностью индуцировать интерферон частично связаны и ранее выявленные свойства этих препаратов.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФИЛЬТРАТА БАЗИДАЛЬНЫХ ГРИБОВ *AURICULARIA AURICULA* (HOOK.) UNDERW. И *TREMELLA MESENTERICA* (RETZ.) FR.

Яценко Т. А., Бойко С. М.

Донецкий национальный университет, Донецк

Высшие базидиомицеты представляют большой интерес с теоретической и практической точки зрения. Особенного внимания заслуживают дереворазрушающие грибы, являющиеся источником большого разнообразия ферментов. Ферментативные препараты являются мощным средством переработки практически любого биологического сырья. Пектолитические ферменты используют в пищевой (приготовление вин, пива, соков) и в текстильной (мацерация раститель-

ного материала) промышленности, в животноводстве (комплексные препараты) и т. д. Недостаточная исследованность ферментов пектолитического действия среди базидиомицетов вызывает к ним научный интерес.

Целью нашего исследования было изучение динамики пектолитической активности культурального фильтрата изолятов А-1 и А-3 *Auricularia auricula* (Hook.) Underw. и Тм-1 *Tremella mesenterica* (Retz.) Fr., а также некоторых биохимических показателей в процессе культивирования.

Грибы культивировали на стандартной глюкозо-пептонной среде, где в качестве источника углерода вместо глюкозы использовали цитрусовый пектин в концентрации 9 г/л, в течении 30 суток при температурах 28°C и 32°C. Каждые 5 суток в культуральном фильтрате измеряли активность полигалактуроназы йодометрическим методом. За единицу пектолитической активности принимали количество фермента, которое при 25°C и рН 4. 0 за 1 минуту освобождает 1 ммоль галактуронової кислоты из полигалактуронової. Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли на спектрофотометре СФ-26. Полученные результаты обрабатывались статистическими методами анализа.

В результате проведенных исследований установили, что наибольшую интенсивность накопления внеклеточных пектолитических ферментов проявила культура А-1 *A. auricula* при температуре культивирования 28°C. Максимум активности составил 5, 73 ед/мл (15 сутки культивирования). У культуры А-3 при этой же температуре показатели были более низкие (1, 96 ед/мл). Температура 32°C для обеих культур оказалась менее подходящей, активность на протяжении всего времени культивирования колебалась в пределах 0, 02 – 0, 24 мг/мл.

У культуры Тм-1 *Tremella mesenterica* пектолитическая активность при 28°C достигла максимума на 20 сутки – 2, 33 ед/мл. При 32°C пектолитическая активность не превышала 0, 04 – 0, 07 ед/мл.

Содержание белка в культуральной жидкости изолятов А-1 и А-3 при 28°C имеет два максимума на 15 и 30 сутки: 3, 07 мг/мл и 4, 38 мг/мл для культуры А-1; 5, 96 мг/мл и 6, 06 мг/мл для культуры А-3. При 32°C максимум концентрации белка для культуры А-1 составил 4, 78 мг/мл на 25 сутки, а для культуры А-3 – 5, 39 мг/мл на 20 сутки. Содержание белка в культуральном фильтрате гриба Тм-1 *T. mesenterica* также имело несколько максимумов: 2, 61 мг/мл и 2, 3 мг/мл на 5 и 15 сутки соответственно при 28°C, и 2, 41 мг/мл и 2, 19 мг/мл на 5 и 30 сутки при 32°C.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что наиболее интенсивно пектолитические ферменты синтезирует культура А-1 *Auricularia auricula*, что говорит о необходимости дальнейшего изучения этой культуры.

ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ НА ВКУСОВЫЕ КАЧЕСТВА ХЛЕБНОГО КВАСА

Филимонова Т. И., Борисенко О. А.

ГУ ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва

Хлебный квас – напиток, обладающий приятным ароматом свежеспеченного ржаного хлеба и кисло-сладким вкусом. Технология приготовления хлебного кваса основана на комбинированном спиртовом и молочнокислом брожении, разнообразные продукты которого придают квасу освежающее действие и кислую вкус. Симбиоз дрожжей и молочнокислых бактерий приводит к созданию особых условий в сусле и изменяет обычный ход брожения, свойственный каждому из этих микроорганизмов. Наличие в сброженном сусле органических кислот и спиртов приводит к частичному взаимодействию их с образованием эфиров, которые даже при незначительном содержании играют определенную роль в формировании аромата кваса.

В классическом способе сбраживания квасного сусла используют квасные дрожжи расы М квасная. Дрожжи этой расы относятся к виду *Saccharomyces minor* (syn. *S. paradoxus*).

В стремлении упростить процесс сбраживания квасного сусла используют вместо дрожжей расы М квасная другие дрожжи-сахаромицеты. Чаще всего применяют прессованные хлебопекарные дрожжи, которые, однако, могут содержать микроорганизмы, опасные для здоровья человека.

Нами ставилась задача сравнить активность разных рас дрожжей-сахаромицетов и вкусовые характеристики получаемого продукта, чтобы выбрать наиболее перспективные расы для получения кваса с хорошими вкусовыми характеристиками.

Интенсивность сбраживания сусла расами дрожжей характеризуется количеством двуокиси углерода, выделившейся за время брожения. Эксперименты показали, что бродильная активность квасных дрожжей расы С-2 на 20-28%, а расы КБ-4 на 7-8% выше, чем бродильная активность расы М квасная. Две другие расы: М квасная- VI и 7Д сбраживали квасное сусло менее активно, чем расы С-2, КБ-4 и М квасная.

Приятный нежный, мягкий кисло-сладкий вкус отмечен в трех образцах, где использовались расы М квасная, С-2 и КБ-4. Квас, сброженный дрожжами рас М квасная- VI и 7Д, имеет разлаженный сладковатый вкус.

При микроскопировании осадка дрожжей после сбраживания квасного сусла было выявлено, что наиболее устойчивыми к автолизу являются дрожжи расы КБ-4: 1, 6% мертвых клеток к общему количеству дрожжевых клеток, у рас М квасная, М квасная- VI и 7Д - 2, 8-4, 6%. Наименее устойчивые к автолизу дрожжи расы С-2: 17% мертвых клеток.

Таким образом, по совокупности признаков: вкусовые качества кваса, бродильная активность и автолизная устойчивость – из пяти рас квасных дрожжей можно отобрать расу КБ-4 как наиболее перспективную для использования в производстве кваса.

С целью проверки возможности использования в квасоварении пивных и винных дрожжей проводили сбраживание квасного сусла с применением пивных дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* рас 8aM и 34 и винных дрожжей *S. vini* рас Ленинградская и Штейнберг-6.

Из четырех рас наиболее активными являются дрожжи винной расы Штейнберг-6. Бродильная активность дрожжей расы Штейнберг-6 на 10-20% превышает бродильную активность пивных рас 8aM и 34 и винной расы Ленинградская. Раса Штейнберг-6 устойчива к автолизу: количество мертвых клеток 2, 2%, у остальных трех рас 4, 2% мертвых клеток. По органолептической оценке кисло-сладкий, мягкий, нежный вкус имел только образец, сброженный расой Штейнберг-6. Вкус кваса, полученного при использовании пивных рас 8aM и 34 и винной расы Ленинградская, неудовлетворительный: кислый, пустой, с горечью. То есть, для квасоварения пригодны дрожжи винной расы Штейнберг-6.

Дрожжи-сахаромицеты, не сбраживающие сахарозу, получены скрещиванием винных дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus* и *Saccharomyces globosus* или пивных дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* и винных *Saccharomyces globosus*. Все образцы кваса, сброженного пятью гибридными расами дрожжей, имели хорошее осветление. Наиболее приятный кисло-сладкий, мягкий, нежный вкус получается с гибридными расами 49/09 и 131-К. Эти две расы имеют хорошую устойчивость к автолизу. Раса 131-К ранее уже использовалась для приготовления кваса. Гибридная раса 49/09 быстрее других дрожжей начинает сбраживать квасное сусло, превосходя в первые сутки остальные расы. Гибридные дрожжи рас 49/09 и 131-К можно предложить для использования в случае бочкового непастеризованного кваса. Применение этих дрожжей позволит остановить процесс брожения, чтобы получить продукт, содержащий небольшое количество спирта, при этом можно сохранить часть несброженного сахара как вкусовое вещество.

TRAMETES HIRSUTA (WULFEN) PILBT CF-28 – ПРОДУЦЕНТ ФЕРМЕНТА ЛАККАЗЫ

**Горшина Е. С., Русинова Т. В., Бирюков В. В., Морозова О. В., Ярополов А. И.
Московский государственный университет инженерной экологии, Москва**

Лакказы – востребованный промышленностью фермент класса оксидоредуктаз (КФ 1.10.3.2 п-дифенол: кислород оксидоредуктаза), применение которого возможно в различных сферах, таких как: органический синтез; текстильная промышленность (отбеливание тканей); кожевенное производство; косметическая промышленность; детоксикация и обесцвечивания сточных вод; биодegradация ксенобиотиков; создание биосенсоров; пищевая промышленность и др.

Важнейшим фактором, обеспечивающим возможность промышленного производства ферментов, является выбор высокопродуктивного штамма-производителя. Способность продуцировать лакказы обнаружена в растениях и разных группах микроорганизмов, однако для промышленного применения пригодны только высоко редокс-потенциальные лакказы, синтезируемые лигнолитическими ксилотрофами, относящимися к классу *Basidiomycetes*. Наибольшее значение из которых как продуценты лакказы имеют грибы рода *Trametes* Fr. (пор. *Aphyllphorales*, сем. *Polyporaceae*), обладающие к тому же высокой скоростью роста и нетребовательностью к составу питательной среды. Однако уровень лакказной активности имеет существенную штаммовую и видовую вариабельность (в наших исследованиях для рода *Trametes* он различался более чем в 100 раз). Другим важным фактором для промышленного производства фермента является состав ферментативного комплекса, определяющий сопутствующие ферменты в техническом препарате или сложность выделения при получении чистого препарата.

Кроме того, важнейшим требованием является устойчивость в культуре, в том числе при многократных пассажах при глубинном культивировании с сохранением ферментативной активности. Отобранный нами в процессе длительной работы штамм *T. hirsuta* (Wulfen) Pilbt) CF-28 обладает высокой оксидазной активностью [Горшина и др., 2006, Патент РФ № 2345135], устойчив в культуре, сохраняет пряжки в процессе глубинного культивирования.

Оптимизация условий культивирования (рН, температура, аэрация, перемешивание) позволяет повысить активность в 3-4 раза.

Показана возможность увеличения синтеза лакказы за счет изменения качественного и количественного состава питательной среды. Так, на неподходящей среде лакказная активность штамма *T. hirsuta* CF-28 составляла менее 0,7 МЕ, на среде с подобранными компонентами питательной среды – 6,8 МЕ, на среде оптимизированного состава питательных компонентов с оптимальным количеством Cu^{2+} – 32,3 МЕ, на оптимизированной среде с лигноцеллюлозным индуктором – 80 МЕ.

Исследованиями, проведенными совместно с Институтом им. А.Н. Баха РАН показано, что основным ферментом оксидазного комплекса этого штамма является голубая высокопотенциальная лакказа, что существенно упрощает процесс выделения фермента. Окислительно-восстановительный потенциал ее составляет $(780 \pm 20 \text{ мВ})$ [Shleev et al., 2004], что делает возможным ее использование в промышленности.

НОВОЕ ВОЗОБНОВЛЯЕМОЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МИКОПРОТЕИНА

Горшина Е. С., Щербакова Н. С., Русинова Т. В., Бирюков В. В.

Московский государственный университет инженерной экологии, Москва

Пищевой микопротеин – биомасса мицелия дейтеромицетов, получаемая путем глубокого культивирования. Микопротеин относится к группе продуктов здорового питания, обладает высоким содержанием белка (30-35 % по сумме аминокислот), содержит все незаменимые аминокислоты, в том числе лизин, фосфолипиды, витамины, микроэлементы и другие ценные биологически активные соединения. Не раздражает слизистые желудочно-кишечного тракта, ускоряет их заживление при воспалительных процессах, выводит из организма тяжелые металлы и радионуклиды, нормализует липидный обмен, способствует восстановлению нормальной микрофлоры при дисбактериозах, улучшает состояние при пищевых аллергиях, способствует снижению уровня свободных радикалов при стрессах и повышению гемоглобина при железодефицитной анемии. К настоящему времени в МГУИЭ разработана современная технология производства микопротеина с использованием природного (генетически не модифицированного) нетоксичного штамма *Fusarium sambucinum* var. *ossiculum* (Berk. et Curt.) Vilai шт. ВСБ-917 в качестве продуцента. В качестве основного источника углерода в этой технологии был предложен гидролизованный пшеничный крахмал. Целью настоящих исследований было создание питательной среды для культивирования гриба *F. sambucinum* на основе более дешевого сырья (пшеничной и тритикалевой муки). Разрабатываемая питательная среда должна заменить применяемые в настоящее время среды на основе крахмала и мелассы.

Тритикале (гибрид ржи и пшеницы – *triticum+secale*), обладает повышенной морозостойкостью, пониженной требовательностью к плодородию почвы, устойчивостью к грибным болезням, таким как мучнистая роса, твердая и пыльная головня, бурая ржавчина. Содержание белка в тритикале выше, чем в ржи, и сравнимо с пшеницей, однако его хлебопекарные качества существенно хуже. Стоимость муки тритикале ниже по сравнению с другими видами крахмалсодержащего сырья, в связи с чем она может быть перспективным сырьем для биотехнологического производства. Для сравнения накопления биомассы штаммом на средах с пшеничным крахмалом, мукой пшеничной и мукой тритикале была проведена оптимизация состава питательной среды с каждым из указанных компонентов. Оптимизацию проводили по методу Бокса – Уилсона. Сравнивали различные по количественному соотношению компонентов варианты сред, включающие крахмалосодержащее сырье, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , кукурузный экстракт. Показано, что мука тритикале является наиболее экономически выгодным сырьем, поскольку позволяет получить наибольшее накопление биомассы (31 г/л) с наибольшей продуктивностью (15,8 г/л·сут) и высоким экономическим коэффициентом (0,64), являясь при этом наиболее дешевым сырьем. Показано также, что для всех трех сред ферментативный гидролиз с использованием б-амилазы (препарат амилосубтилин) не приводит к увеличению скорости роста культуры. Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать питательную среду для производства микопротеина с использованием муки тритикале в качестве основного сырья, увеличить выход биомассы в 1,5 раза и снизить затраты на производство.