

Раздел 12

БИОТЕХНОЛОГИИ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ЭСТЕРАЗ

*Айзенберг В. Л., Захарченко В. А., Сырчин С. А., Капичон А. П.,
Твердохлеб И. А., Савицкая-Жуковская Р. Н., Краковяк А. Г.*
Институт микробиологии и вирусологии Национальной Академии наук Украины
03143, Украина, Киев, ул.Заболотного, д. 154

В отделе физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины (ИМВ НАН У) селекционирован гриб *Rhizopus cohnii* — продуцент экзо-липазы (КФФ 3.1.1.3). Описаны признаки термотолерантности гриба *R.cohnii*, оптимизированы условия биосинтеза липазы, составлен лабораторный регламент её получения. Штамм защищен патентом Украины.

В настоящее время совместно с Институтом биотехнологии агропищевой промышленности (Варшава, Польша) проводится дальнейшее углублённое изучение свойств липазы из *R.cohnii* с целью её иммобилизации. На оптимизированной среде с подсолнечным маслом липолитическая активность (ЛА) культуральной жидкости (КЖ) составила 500-900 ед/мл. КЖ гриба хорошо подвергается концентрированию. С помощью вакуум-выпаривания и ультрафильтрации ЛА активность КЖ увеличивалась в 5-60 раз по сравнению с исходной. В образцах ферментных препаратов, полученных осаждением органическими растворителями, ЛА варьировала от 30000 ед/г до 500000 ед/г.

Липаза из *R.cohnii* проявляла сродство к субстратам с длинной углеродной цепью ($K_m=0,2mM$). Додецилсульфат, тритон X-100 и Твин 80 в концентрации 0,05% ингибировали активность фермента.

Высокая гидролитическая способность липазы из *R.cohnii* по отношению к разнообразным растительным маслам позволит создать биотехнологию получения эссенциальных ненасыщенных жирных кислот. Данная липаза помимо фармацевтики, найдет при-

менение в косметологии, кормпроизводстве и др.

В результате направленного ступенчатого скрининга среди коллекционных культур отдела получены мезофильные микромицеты — продуценты пектинэстеразы (ПЭ, КФ 3.1.1.11). *Penicillium dierckxii* 57699 — высокоактивный «моноферментный» штамм (ПЭ=5,3 ед/мл) и *Penicillium sp. 8H* — продуцент комплекса пектиназы с преимущественным синтезом пектинэстеразы (ПЭ=3,5 ед/мл). Изучены условия культивирования грибов — продуцентов ПЭ, оптимизированы среды для их выращивания, определены основные свойства ПЭ грибов, разработана технологическая схема получения фермента ПЭ. В образцах ферментных препаратов, полученных осаждением органическими растворителями, ПЭ активность у *Penicillium sp. 8H* и *Penicillium dierckxii* 57699 варьировала от 150ед/г до 300 ед/г соответственно.

Совместно с Институтом винограда и вина (ИВиВ) «Магарач» (Ялта, Крым) впервые установлена возможность использования ПЭ из *Penicillium dierckxii* на стадии демеоксилирования сырья для получения яблочного пектина. Полученный низкометоксилированный пектин имеет высокую комплексообразующую способность, что позволяет рекомендовать данную биотехнологию для производства пектина лечебно-профилактического назначения. Ферментный препарат из *Penicillium sp. 8H* может применяться в сельском хозяйстве наряду с другими ферментами в процессе силосования кормов и для предпосевной обработки семян с/х культур.

ПРЕДПОЧТЕНИЕ ВИДАМИ РОДА *TRICHODERMA* РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ

Александрова А. В., Великанов Л. Л., Сидорова И. И.
МГУ, Биологический факультет, кафедра микологии и альгологии
119899, Москва, Воробьевы Горы, МГУ Биологический факультет

Гифомицеты рода *Trichoderma* широко используются для получения ферментов и биологически активных веществ, а также в биологической борьбе с болезнями сельскохозяйственных культур. В связи с этим постоянно идет поиск новых более активных штаммов с заданными свойствами.

Проведенные исследования распространения видов рода *Trichoderma* в России показало, что большинство видов предпочитают определенный субстрат. Наиболее субстратоспецифичным оказался вид *T.hamatum* (90,9% всех изолятов которого были выделены из почвы). Некоторые другие виды также чаще всего встре-

чаются в почве: *T.virens* (82,4%), *T.asperellum* (73,5%), *T.koningii* (58,1%) и *T.atroviride* (52,8%). *T.citriniviride*, явно предпочитает разлагающуюся древесину (85,2% всех изолятов этого вида выделено именно с древесины), там же найдена и его телеоморфная стадия — *Hypocrea schweinitzii*. Интересно отметить, что этот вид близок к тропическому виду *T.reesei*, широко используемому за рубежом как продуцент целлюлозолитических ферментов. Древесину предпочитает также и *T.viride* (49,4%). Вид *T.harzianum* обитал преимущественно на плодовых телах грибов (49,1% всех изолятов), причем он не проявлял приуроченности к какому либо конкретному виду или группе макромицетов и был обнаружен на видах 27 грибов из двух отделов. Другие виды этого рода не столь субстратоспецифичны, но все равно имеют некоторые предпочтения. Так 43,5% изолятов *T.polysporum* выделено из почвы 35,3% — с древесины и 21,2% — с макромицетов. Вид *T.longibrachiatum* предпочитал почву — 50,3% и плодовые тела грибов — 41,8%, а на древесине было только

7,9%. Кроме того грибы этого рода встречается на субстратах, связанных с человеческой деятельностью. Так, *T.viride* была обнаружена на картонных коробках, *T.koningii* на рубероиде, *T.viride*, *T.koningii* и *T.harzianum* на субстрате для выращивания грибов, *T.citriniviride* и *T.viride* на свежих досках и деревянных постройках.

Таким образом, можно сделать вывод, что активных продуцентов целлюлозолитических и лигнинолитических ферментов надо искать среди видов *T.citriniviride* и *T.viride*, выделенных с древесины. Среди этих же видов нужно искать активные штаммы для утилизации целлюлозосодержащих отходов. Поиск активных штаммов для биоочистки загрязненных почв выгоднее искать среди видов предпочитающих почву как основную среду своего обитания. А поиск агентов биоконтроля выгоднее вести среди изолятов вида *T.harzianum*, где которых можно найти штаммы, активно паразитирующие на патогенных грибах, но практически не выделяющие токсины могущие вызвать токсикозы почв или попадать в продукты питания.

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА *PLEUROTUS* (KUMM.)

Белицкий И. В., Краснополяская Л. М.

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН
Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11

Грибы традиционно входят в рацион питания народов, населяющих Россию. Они содержат белок, сходный по аминокислотному составу к животному, витамины и минеральные вещества. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон. Подавляющее большинство съедобных грибов способно синтезировать биологически активные вещества, перспективные для профилактики и лечения целого ряда серьезных болезней. В настоящее время получение экологически безопасной грибной продукции возможно только при искусственном выращивании съедобных грибов в строго контролируемых условиях.

В России вешенка устричная занимает второе место после шампиньона двуспорового по объемам производства благодаря относительно несложной биотехнологии выращивания и высоким потребительским свойствам. Конкуренция, существующая на рынке сбыта плодовых тел вешенки, предъявляет повышенные требования к эффективности производства, которая во многом зависит от степени реализации генетического потенциала штаммов. В работе рассматриваются основные направления совершенствования био-

технологий культивирования грибов рода *Pleurotus* (Kumm.).

1. Селекция новых штаммов (сортов) грибов рода *Pleurotus*, направленная на повышение продуктивности и конкурентоспособности.

2. Создание коллекции промышленных штаммов грибов рода *Pleurotus* и разработка методов их длительного хранения без ухудшения хозяйственно ценных свойств.

3. Оптимизация технологий получения посевного материала грибов рода *Pleurotus* с целью обеспечения генетической стабильности гибридных штаммов и высокой метаболической активности.

4. Разработка мало энергоемких технологий получения селективного субстрата для культивирования грибов рода *Pleurotus* с использованием термо — и мезофильных микроорганизмов.

5. Применение регуляторов роста и развития грибов для повышения продуктивности, товарных свойств, увеличения конкурентоспособности и устойчивости к неблагоприятным факторам.

6. Расширение ассортимента за счет новых видов грибов рода *Pleurotus* для более полного удовлетворения запросов производителей и потребителей.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ДИКЕТОПИПЕРАЗИНОВОГО АЛКАЛОИДА РОКЕФОРТИНА

Бойченко Д. М., Решетилова Т. А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, РАН
142290, Московская область, Пушкино, Проспект Науки, д. 5

Одним из наиболее интересных вторичных метаболитов микроорганизмов является рокефортин — дикетопиперазиновый алкалоид (микотоксин) грибов

рода *Penicillium*. Внимание специалистов обусловлено высокой биологической активностью рокефортина и широким распространением в природе его продуцен-

тов. Описано нейротоксичное (треморгенное), антибиотическое и антипротозойное действие этого алкалоида. Кроме того, рокефортин используется в научно-исследовательской практике. Таким образом, существует потребность в этом алкалоиде в качестве стандарта в токсикологическом мониторинге и биохимического реактива. Следовательно, вопросы препаративного получения рокефортина приобретают все большее значение.

По совокупности биохимических и санитарно-эпидемиологических свойств наиболее перспективным для получения рокефортина оказался *P.roquefortii*. На основе коллекционной культуры *P.roquefortii* ВКМ F-2389 методом индуцированного мутагенеза получен штамм-продуцент *P.roquefortii* f39, интенсивность синтеза рокефортина у которого превышала таковую штамма дикого типа в 2,5-3 раза.

Для мутантного штамма определены факторы повышения синтеза алкалоида. Оптимальной для накопления рокефортина является среда, содержащая два источника энергии — янтарную кислоту и маннит. Наиболее значимое количественное действие на алкалоидообразование оказывали уровень аэрации, pH среды, концентрация источников энергии. При подборе условий биосинтеза установлено, что неоднократно описанный у грибов малопредсказуемый „осцилляторный”

характер накопления алкалоидов обусловлен колебаниями pH среды при росте продуцента. В свою очередь, диапазон изменений pH зависел от источника азотного питания. Так, часто используемые для выращивания продуцентов алкалоидов соли аммония вызывали значительное падение концентрации рокефортина при смене источника питания гриба (янтарной кислоты на маннит). Нами был подобран состав среды, препятствующий проявлению диауксии. При использовании в качестве источника азота мочевины отмечалось плавное, без периодов падения накопление алкалоида. Это повысило воспроизводимость и надежность процесса микробиологического получения рокефортина.

Установлены условия наиболее полного выделения рокефортина из культуральной жидкости. Показано, что причинами наибольших потерь на стадии выделения являются:

1. деградация алкалоида мицелием при изменении условий культивирования;
2. химическая модификация рокефортина продуктами разложения хлороформа, используемого для экстракции алкалоида из культуральной жидкости.

На основании полученных данных предложена схема культивирования продуцента, позволяющая получать рокефортин с выходом до 60-70 мг/л среды культивирования.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЭРГОАЛКАЛОИДА АГРОКЛАВИНА

Бойченко Л. В., Арибасаров М. У.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, РАН
142290 Московская область, Пушкино, Проспект Науки, д. 5*

Эргоалкалоиды — индолные соединения, обладающие широким спектром биологической активности. Они находят применение в медицине благодаря способности взаимодействовать с рецепторами нейромедиаторов адреналина, серотонина и дофамина. Известно, что агроклавин обладает противоопухолевым и антипаркинсоническим действием.

В качестве продуцента агроклавина использовался гриб *Claviceps sp.* ВКМ F-2609, синтезирующий смесь эргоалкалоидов. Методом ультрафиолетового мутагенеза на его основе был получен мутантный штамм с106, уровень синтеза агроклавина у которого возрос в 10-15 раз по сравнению с исходной культурой, а образование других алкалоидов было снижено. Однако по ранее полученным данным концентрация данного алкалоида в культуральной жидкости с106 не превышала 350 мг/л, что недостаточно для масштабного производства. На основании литературных данных был подобран и протестирован ряд сред, наиболее благоприятствующих синтезу эргоалкалоидов у различных видов *Claviceps*. По результатам анализа оптимальная среда позволяла получить 1,5 г агроклавина/л культуральной жидкости, что в 4 раз больше, чем было получено ранее для мутантного штамма, и в 40 раз больше, чем для штамма дикого типа. Доля агроклавина составляла до 95% от алкалоидной фракции, что позволило упростить количественный анализ алкалоида. Нами была показана достоверность ана-

лиза содержания агроклавина методом УФ-спектрометрии непосредственно смеси алкалоидов, который значительно проще применявшегося ранее метода ВЭЖХ.

После подбора среды для культивирования штамма с106 было исследовано влияние ряда технологических факторов на выход агроклавина. Определены оптимальные уровни посевного материала, pH среды, аэрации для синтеза агроклавина и продолжительности культивирования. По результатам исследований предложена схема культивирования штамма-продуцента, позволяющая получить до 2 г агроклавина/л культуральной жидкости.

Кроме того, была разработана процедура длительного хранения продуцента. Хранение культуры обеспечивалось на агаризованной среде Т2 при 4°C, на той же среде под вазелиновым маслом при 4°C и жидкой среде Т25, содержащей 10% диметилсульфоксида или 7% глицерина при -70°C. Биосинтетический потенциал продуцента был проверен через 6 месяцев. При использовании агаризованной среды наблюдалось значительное падение жизнеспособности гриба. Наиболее высокие жизнеспособность и интенсивность синтеза агроклавина была отмечена при хранении культуры при -70°C на среде, содержащей глицерин. Более того, хранение продуцента в этих условиях приводило к некоторому увеличению синтеза алкалоида (на 10% больше, чем в контроле).

ПОЛУЧЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ ШИРОКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

Денисов В. В., Мартемьянова Н. А., Нетрусов А. И.

Российский Химико-Технологический Университет им. Д.И.Менделеева

125047, Москва, Миусская пл., д. 9

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова

119899, Москва, МГУ

В работе рассматривается возможность получения нового природного пигмента, полученного путем микробиологического синтеза, и возможность использования его в качестве красителя широкого применения в легкой промышленности. Продуцентом пигмента является культура гриба рода *Nuromuses*, являющаяся непатогенной и нетоксичной.

Разработаны основы биосинтеза пигмента культурой гриба: подобраны агаризованная, жидкие посевная и ферментационная среды; условия ведения процесса — время культивирования, температура, рН.

Показана возможность культивирования штамма-продуцента на недорогостоящей минеральной среде, где в качестве источника углерода используется 1-2% крахмальный сироп, что предполагает возможным использование при производстве пигмента промышленных отходов крахмало-паточных производств.

Разработаны методы выделения пигмента из микроорганизма и методы очистки пигмента от балластных и сопутствующих примесей.

Определен класс химического соединения к которому относится пигмент.

Изучен химический состав липидов, составляющих липид-пигментный комплекс (ЛПК).

Изучены физико-химические свойства пигмента и ЛПК.

Показано, что липиды оказывают существенное влияние на физико-химические свойства пигмента.

Установлено, что пигмент в виде ЛПК является устойчивым к кислороду воздуха, видимому и УФ излучению, длительному хранению и нагреванию до 95°C.

Показана возможность получения целевых продуктов — красителей широкого назначения — на основе выделенного пигмента в виде ЛПК, основанная на технологии микробиологического синтеза при утилизации крахмалосодержащих отходов.

В настоящее время ведутся исследования, целью которых является изучение специфики влияния липидов на физико-химические свойства пигмента.

ОЛЕОБИОТЕХНОЛОГИЯ. ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ И ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Евстигнеева Р. П.

Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова

117571, Москва, проспект Вернадского, д. 86

В последние годы сформировалась важная ветвь биотехнологии, а именно олеобиотехнология, в основе которой лежит микробиологический синтез липидов, их фрагментов и метаболитов. Потребность в этих веществах определяется их ценными биологическими свойствами, которые позволяют получать на их основе различные лекарственные препараты. Кроме того, начали развиваться исследования по использованию жирных кислот в качестве дизельного топлива. В случае успешного завершения данных исследований резко возрастут объемы биотехнологической продукции. Учитывая сложные взаимоотношения различных

веществ, с которыми приходится иметь дело в процессе их производства, необходимо создание наукоемкой технологии, базирующейся на фундаментальных исследованиях липидов и сопутствующих веществ.

В докладе будут рассмотрены продуценты липидов, полиненасыщенных жирных кислот и влияние экзогенных веществ витаминной природы на рост биомассы, липогенную активность и уровень эйкозаполиеновых кислот в клетках живых организмов, что позволит использовать биорегуляцию процесса биосинтеза веществ липидной природы в зависимости от требуемой продукции.

БИОТЕХНОЛОГИЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Феофилова Е. П.

Институт микробиологии РАН

117811, Москва, проспект 60-летия Октября, к.7а

Вступление человечества в 2001 г. совпало с признанием приоритетной важности биотехнологии, ставшей приоритетным направлением, которое Организация Объединенных Наций официально признала

передовой технологией 21 века. Если биотехнология — это основа научно-технического прогресса любой страны, то основными продуцентами биологически активных веществ признаны мицелиальные грибы. Это

положение не умаляет значение в современной биотехнологии дрожжевых организмов, внесших значительный вклад в получение ряда коммерческих продуктов, перечисляемых ниже и позволяющих представить себе аспект биотехнологических производств, соответствующих концу 20 века. Это антибиотики, аминокислоты, вина, пиво, виски, спирт-ректификат, ферменты, агенты биоконтроля, хлеб, сыры, пищевые красители, средства для консервации, органические кислоты, гербициды, пеногасители и др.

К началу 21 века в биотехнологии сформировались новые направления. Это — новая отрасль медицины (фармацевтическая микология), имеющая значительные перспективы на медицинском рынке лекарств в области антиканцерогенных, антиспидовых и ранозаживляющих препаратов. Отмечается возобновление интереса к биотехнологии получения на основе мицелия высших грибов так называемых «нетканых» материалов. Интенсивно начинают развиваться биотехнологии получения антиоксидантов (производных изопреноидов) и непатогенных красителей. Усовершенствуются биотехнологии, направленные на получение липидов из мицелиальных грибов, которые предполагается вводить в специальные диеты, а также создаются биотехнологии по получению пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса высших грибов. В грибоводстве предпочтение начинают получать «деликатесные» грибы — *Tuber*, *Armillaria matsutake* и др.

Развитие новых биотехнологий привело к опреде-

ленному прогрессу в области методологии биотехнологических процессов, например, при получении посевого материала и установлении его жизнеспособности, а также в методах проведения и контроля ферментаций. Все шире начинается использование в биотехнологии в качестве питательных сред отходов производств, например, предгидролизатов целлюлозно-бумажных предприятий и отходов бытового мусора (рециклизация). Новые данные о биохимической адаптации к стрессу, о протекторной роли углеводов цитозоля и модификациях в мембранных липидах способствовали использованию в биотехнологии для получения новых продуктов стрессовых факторов, среди которых особый интерес вызывает действие видимого света. Современные данные по этиологии важнейших болезней, вызываемых грибами, позволяют более правильно выбирать оптимальный набор с/х культур, чередующихся в севообороте, и корректировать методы борьбы с почвообитающими патогенами. Этому способствует также изучение генетического контроля и биохимической природы вегетативной несовместимости грибов, позволяющие с новых позиций рассматривать реакции свехчувствительности и гаметофитной несовместимости.

В заключительной части доклада отмечается, что особенностью микологической биотехнологии 21 века является то, что наряду с использованием генетических методов все интенсивнее начинают использоваться достижения в области физиологии и биохимии грибов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ И БИОЛОГИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Гаврилова В. П., Королева О. В.*

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 2

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН
117071, Москва, Ленинский проспект, д. 33

Базидиомицеты являются уникальными объектами для биотехнологии. Они могут быть использованы как продуценты белка и незаменимых аминокислот, биологически активных веществ, ферментов различных классов. Многочисленные исследования показали возможность культивирования базидиальных грибов глубинным способом, который широко применяется в современной микробиологической промышленности. Способность базидиомицетов синтезировать внеклеточные ферменты различного спектра действия, характеризующиеся высокой активностью и стабильностью, дает возможность использовать фильтраты грибов для практических целей. По специфичности действия биологические катализаторы из базидиомицетов не уступают ферментам, выделенным из растительного и животного сырья. С развитием биотехнологии базидиомицеты становятся доступным промышленным источником биологических катализаторов, таких, как оксидазы, протеазы, амилазы, а также специфических белков, в частности, гемагглютининов.

Базидиальные грибы, как продуценты, имеют ряд

преимуществ перед другими организмами. Эти грибы способны расти на легко доступных питательных средах, включая отходы некоторых производств (микробиологического, гидролизно-дрожжевого, льноперерабатывающего и др.). Наши исследования показали, что отдельные штаммы базидиомицетов способны, утилизируя отходы, наращивать биомассу с высоким содержанием белка и синтезировать ферменты, в том числе лакказы и пероксидазы. Одной из важных особенностей базидиомицетов является отсутствие спороношения на мицелиальной стадии, что обеспечивает экологическую безопасность производства их выращивания. Кроме того, накопление ферментов в культуральной жидкости упрощает процессы их выделения. Относительно невысокая скорость роста базидиомицетов по сравнению с низшими грибами в промышленных условиях создает повышенные требования к соблюдению стерильности процесса культивирования, что ведет к энергетическим затратам. Однако, наши исследования показали, что, создавая определенные условия культивирования, можно добиться существенного сокращения его продолжитель-

ности для получения желаемого результата. Так, время роста в поверхностной культуре *Marasmius oreades* (Bolt.: Fr.) Fr. и *M. scorodonius* (Fr.) Fr. — продуцентов гемагглютининов составляло 4 — 5 недель. Оптимизировав условия культивирования (питательная среда, температура, скорость и периодичность перемешивания) нам удалось сократить время ферментации в три раза при сохранении выхода специфического белка. Путем подбора условий сокра-

щена продолжительность культивирования в ферментере базидиомицетов *Coriolus hirsutus* (Wulf ex Fr.) Quel., *C. zonatus* (Fr.) Quel., *Cerrena maxima* (Fr.) Murr. — продуцентов лакказы, до 2 — 5 суток, что вполне приемлемо для производства.

Культивирование базидиомицетов и получение на их основе различных препаратов не требует модификации оборудования, которое используется в современной микробиологической промышленности.

БИОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Горовой Л. Ф., Бурдюкова Л. И.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, д. 148

Клеточная стенка грибных гиф — это сложная по строению и развитию полифункциональная органелла. На долю клеточной стенки приходится значительная, а у многих видов и большая часть биомассы гриба. В настоящее время основная масса накопленных знаний относится к клеточной стенке низших грибов. Клеточная стенка обширной и разнообразной группы высших базидиомицетов изучена относительно слабо.

Наиболее разработана морфология клеточной стенки высших базидиомицетов, поскольку этот признак давно используется в систематике и таксономии. Однако по ультратонкой структуре до сих пор много вопросов. Использование послойного химического и ферментативного разрушения в сочетании с электронной микроскопией и другими методами анализа не позволяет полностью и достоверно проследить за взаимопроникновением компонентов соседних слоев.

Основным структурным биополимером клеточной стенки высших базидиомицетов принято считать хитин. По рентгеновским, ИК-спектрам и химическому составу он очень близок к хитину ракообразных. Содержание хитина в клеточной стенке колеблется в довольно широких пределах. Наиболее высокое — до 65% — оно у некоторых афиллофоровых грибов. Грибной хитин имеет форму микрофибрилл, которые образуют в клеточной стенке пространственную решетку.

Вторым основным компонентом клеточной стенки высших базидиальных грибов являются глюканы

— разнообразная группа полисахаридов D-глюкозы. Различают несколько фракций глюканов: водорастворимые, щелочерастворимые и нерастворимые. Грибные глюканы привлекают внимание исследователей, прежде всего, своей высокой иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. Физиологическая роль глюканов в клеточных стенках высших базидиомицетов изучена недостаточно. Очевидной является их роль как запасных веществ, в удержании воды вокруг гифы, «цементируя» микрофибриллы хитина они формируют скелет клеточной стенки. Не вызывает сомнения и участие их в транспорте веществ.

Важным компонентом клеточной стенки высших грибов являются меланины, обеспечивающие грибам устойчивость к неблагоприятным условиям среды обитания. Содержание меланинов может сильно варьировать. Они трудно поддаются точному количественному и качественному определению, поскольку известные методы не позволяют провести их полную количественную экстракцию.

Нами разработанные методы выделения фракций отдельных биополимеров клеточной стенки высших базидиомицетов и их комплексов. Изучение свойств этих биополимеров показало большие перспективы их практического использования в разных областях. Наибольший интерес представляют антибактериальные и противовирусные свойства грибных комплексов, которые по своей эффективности не уступают современным антибиотикам, но в отличие от них не обладают токсичностью.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИДИМОГО СВЕТА В БИОТЕХНОЛОГИИ

Горнова И. Б.

Российский Химико-Технологический Университет им. Д.И. Менделеева
125047, Москва, Миусская пл., д.9

Важнейшим этапом многих биотехнологических процессов является стадия подготовки посевного материала, от качества которого зависит успех последующих ферментаций. Для мицелиальных грибов, используемых в качестве продуцентов ряда ценных вторичных метаболитов, посевным материалом являются

зрелые споры. Поскольку реализация онтогенетической программы любых живых организмов тесно связана с экологическим окружением, привлекательной выглядит перспектива использования экологически чистых факторов для управления процессом спорообразования. Одним из наиболее перспективных

природных регуляторных факторов является свет видимой области спектра.

Было установлено, что свет с $\lambda=650$ нм и с $\lambda=530$ нм оказывает существенное влияние на образование регуляторов роста и интенсивность ростовых процессов грибов рода *Aspergillus*, а также является модификатором липидного и углеводного состава грибных спор. Изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие и могут передаваться в последующую онтогенетическую стадию от спор к мицелию. У мицелия, выращенного из модифицированных под действием света спор, также сохраняется способность к ускоренному росту, наблюдаются изменения в липидном и углеводном составе, а, следовательно, в составе и активности ферментов, имеющих прямое отношение к их метаболизму. Кроме того, меняется и активность экзоферментов, в частности экзоферментов целлюлолитического комплекса.

Показано, что характер наблюдаемых биохимических изменений в клетках грибов зависит как от длины волны, так и от интенсивности освещения, причем снижение интенсивности света сопровождается уси-

лением его регуляторного воздействия. Таким образом, варьируя параметры освещения можно получить споры заданного качества.

Установлена взаимосвязь между химическим составом спорового посевного материала и рядом его свойств, таких как:

- готовность к длительному покою,
- устойчивость к дегидратации,
- готовность к выходу из состояния покоя,
- скорость прорастания,
- скорость накопления биомассы мицелием, выращенным из данных спор,
- активность определенных экзоферментов, которые синтезируют мицелий, выращенный из данных спор.

Полученные данные не только имеют большой практический интерес с точки зрения микологических биотехнологий, но и дают ценную информацию для понимания ряда важных проблем современной фотобиологии, таких как трансдукция светового сигнала, длительность действия светового сигнала в клетке, влияние света на процессы цитодифференцировки у грибов.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ЛЕКАРСТВЕННОГО ГРИБА КОРИОЛА ОПУШЕННОГО

Горшина Е. С., Скворцова М. М., Высоцкий В. Г.
Государственный НИИ биосинтеза белковых веществ
109004 Москва, ул. Б. Коммунистическая, д. 27

Базидиальные грибы-трутовики из рода *Coriolus* (сем. *Poriaceae*), наиболее известным и широко распространенным из которых является *Coriolus versicolor* (*L. et Fr.*) *Quel.* (*каваратаке*), широко используются народной медициной Японии и Китая в виде настоев порошка плодовых тел, а их высокоочищенные экстракты, содержащие полисахариды, известны как препараты, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью, усиливающие клеточный иммунитет, обладающие антиметастатической активностью и снижающие гематологическую супрессию, вызываемую противоопухолевыми лекарствами, а также эффективные при заболеваниях печени различной этиологии.

Авторами разработан биотехнологический способ производства сухой мицелиальной субстанции кориола опушенного (*Coriolus pubescens* (*Shum.: Fr.*) *Quil.*), предусматривающий выращивание мицелиальной массы гриба асептически в условиях глубоководного культивирования на жидких средах, содержащих в качестве основного источника углерода растворимые отходы переработки сельскохозяйственного сырья. Испытания процесса культивирования проведены в промышленных условиях в аппаратах вместимостью 15 м³.

Анализ полученного препарата показал его сходство по химическому составу со съедобными грибами и высокое содержание белка. Аминокислотный состав включает все незаменимые аминокислоты. Со-

став липидной фракции характеризуется высоким (более 60% фракции жирных кислот) содержанием ненасыщенных жирных кислот (олеиновой и линолевой) и эргостерина (вещества с Д-витаминной активностью), а минеральный состав отличается высоким содержанием калия, кальция, фосфора, железа, меди и цинка.

Медико-биологические исследования показали высокую биологическую активность препарата. Клиническими исследованиями установлено, что его прием способствует достоверному снижению уровня накопления опухолево-ассоциированных антигенов (онкомаркеров), а именно: раково-эмбрионального антигена (РЭА), ферритина, накапливающегося при опухолях пищеварительной системы, карбогидратного антигена (СА-125), сопряженного с опухолями яичников, и муциноподобного антигена (МЦА), рост которого выявляется при опухолях молочной железы. 30-дневный курс приема препарата в суточной дозе 2 г достоверно способствует восстановлению дезинтоксикационных свойств печени, в частности, восстановлению до физиологической нормы оксидаз-смешанной функции печени. Получены клинические данные о нормализующем влиянии препарата на клеточный иммунитет организма и, в частности, на количество и соотношение Т и В-лимфоцитов. В настоящее время препарат сертифицирован как пищевая добавка, в дальнейшем предполагается разработка Фармакологической Статьи.

ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ГРИБОМ *SPERGILLUS FOETIDUS* (NAKA.) THOM AND RAPER

Григорян К. М., Киракосян А. Б.

Ереванский государственный университет, Биологический факультет
375049, Армения, Ереван, ул А. Манукяна, д. 1

Среди продуктов микробиологического синтеза, следует особо выделить ферменты, катализирующие расщепление растительных полисахаридов.

Способностью к образованию ферментов, расщепляющих пектины, обладают различные группы микроорганизмов, в том числе микромицеты рода *Aspergillus*.

В результате проведения скрининга 40 штаммов мицелиальных грибов из группы, отобран штамм *A.foetidus* Y-1, обладающий высокой пектолитической активностью — 8.2 ед/мл. Отобранный штамм отличается терморезистентностью. Оптимальная температура роста 38–40° С, а ферментообразования — 40–45° С.

Исследован токсигенный потенциал штамма *A.foetidus* Y-1 методами биоиндикации и ТСХ-флуориметрии. Результаты показали отсутствие токсичных свойств и микотоксинов — афлатоксинов (В₁, В₂, С₁, С₂) и койевой кислоты.

Оптимизированы условия культивирования и состав среды для отобранного штамма. В результате индуцированного 2-х ступенчатого мутагенеза, при внесении индуктора «В», выделен штамм *A.foetidus* Y»1,

с пектолитической активностью равной 25 ед/мл. Наблюдается увеличение пектолитической активности мутантного штамма почти в 3 раза, по сравнению с родительским. Интенсивный биосинтез пектолитических ферментов наблюдается при поверхностном культивировании, по сравнению с глубинным.

Определены оптимальные условия действия ферментного препарата — температура 60–65° С, рН — 4.2–5. При этом, коммерческие препараты имеют температурный оптимум порядка 58°С.

Использование высокопродуктивных мутантов и разработка оптимальных условий выращивания культур мицелиальных грибов, позволяет значительно повысить синтез ферментных препаратов, действие которых обеспечивает наиболее полное расщепление растительных полисахаридов.

Следует отметить, что получение методом селекции, на специфическом субстрате, стабильного в отношении синтеза пектиназ штамма *A. foetidus* Y»1, указывает на перспективность дальнейшей селекционной работы, в том числе с использованием физических, химических мутагенов и специальных, стимулирующих биосинтез пектиназ агентов.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ ПО ГРИБАМ — РЕГУЛЯТОРАМ ЧИСЛЕННОСТИ ВРЕДНЫХ ФИТОФАГОВ В США

Гулий В. В., Гулий С. Ю.

University of Vermont, Plant and Soil Department

Burlington, P.O.Box 53400, Vermont, 05405, USA

Биологическое направление в регуляции численности вредных фитофагов является кардинальным в теоретических и прикладных исследованиях Соединенных Штатов. Высокий уровень оперативной коммуникации и мощные материальные возможности позволяют ученым США быстро анализировать и адекватно реагировать на все значимые исследования, проводимые в мире. Это, в определенной степени, дает основание видеть именно в работах американских ученых и в аграрной политике правительственных учреждений США основные мировые тенденции в развитии биологической защиты растений и ее микробиологического направления. В последние 10 лет в общем объеме работ по микробиометоду энтомопатогенные грибы и грибы-антагонисты фитопатогенов занимают важное место. Существенную стимулирующую роль в этом сыграли грибные эпизоотии в северо-американских популяциях непарного шелкопряда, вызванные энтомофторовым грибом — *Entomophaga maimaiga*, которые снизили численность этого опасного многоядного вредителя до хозяйственно безопасного уровня. Анализ публикаций ученых США по рассматриваемой проблеме за последние 5 лет показывает, что подавляющая часть работ (более 90%) проводится в традиционных направлениях. Это поиск и выделение

новых грибных энтомопатогенов, особенно из класса Zygomycetes; изучение взаимоотношений в системе «гриб-хозяин» на всех уровнях организации живого; оценка различных физических и химических факторов, влияющих на эффективность грибов как биологических средств подавления фитофагов (особое внимание уделяется синергетическому эффекту имидаклоприда) и, наконец, технологические работы, связанные с производством, хранением и применением микропестицидов.

Активно исследуются проблемы влияния энтомопатогенных грибов на нецелевые виды живых организмов.

Американские ученые начали проявлять интерес к энтомопатогенным грибам как к источнику новых ресурсов для биотехнологии. Появились работы по молекулярному клонированию и характеристикам генетических дериватов, отвечающих за инсектицидную активность таких грибов как *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* и некоторых других. В августе 2001 года на ежегодном совещании Общества патологов беспозвоночных в Голландии был представлен доклад исследователей из Мэрилендского университета по результатам первых в мире полевых испытаний генетически трансфор-

мированного энтомопатогенного гриба *M.anisopliae*.

В настоящее время 5 биотехнологических компаний США выпускают микопестициды различного назначения. Наиболее известны препараты на основе энтомопатогенных грибов *B.bassiana*, *P.fumosoroseus* и *Lagenidium giganteum*, нематоцидный препарат на основе *Myrothecium verrucaria* и несколько препаративных форм грибов-антагонистов, в первую очередь *Gliocladium virens* и видов рода *Trichoderma*. Основные микологические исследования проводятся в университетах и научно-производственных организациях Департамента сельского хозяйства США. Расширение и углубление отдельных наиболее перспективных и актуальных направлений осуществляется с помощью распределения финансов, проводимых на конкурсной основе.

Следует особо отметить, что в США общественное мнение служит мощной поддержкой всем исследованиям, являющимся альтернативой химическим методам. Общественный настрой дает стимул правительству для постоянной финансовой поддержки соответствующих работ. Существование открытой конкурсной основы получения финансовых ресурсов является оптимальным способом поддержки наиболее успешно работающих исследователей. Существенное значение в реализации комплексных проектов служит ситуация, когда специалист все жизненные блага получает через заработную плату, и не привязан к жилью. В результате организация, имеющая целевые средства, может быстро привлечь нужных специалистов и сформировать работоспособную команду.

ОСОБЕННОСТИ ОНТОГЕНЕЗА РЯДА МИКРОМИЦЕТОВ — ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ НА ГЛУБИННЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩАХ СОЕДИНЕНИЯ СЕЛЕНА

Ильин Д. Ю., Иванов А. И., Ильина Г. В., Блинохватов А. Ф.
Центральная лаборатория комбината «Биосинтез»
Пензенский государственный педагогический университет;
Пензенская государственная сельскохозяйственная академия
440001, Пенза, ул. Лермонтова, 37
440014, Пенза, ул. Ботаническая, 30

В ходе исследований, посвященных изучению онтогенеза микромицетов *Acremonium chrysogenum*, *Fusidium coccineum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium nigricans*, культивируемых на средах, обогащенных селеном, установлено, что добавление разбавленных (10^{-4} — 10^{-6} г/л) растворов селената натрия в большинстве случаев не безразлично для мицелия, оптимизирует рост и создает кондиционированные условия для развития.

Внесение указанных доз селена в среду оказывает заметное влияние на морфологические особенности гиф мицелия. Так, высокий уровень базофилии протоплазмы сохраняется довольно длительное время; тормозятся процессы автолиза, отмечаемые на поздних сроках культивирования; образование конидий и артроспор, накопление зерен волютина несколько запаздывает в сравнении с контролем. Эти явления, вероятно, есть результат воздействия селената натрия, как одного из факторов, способных замедлять процессы старения культуры.

Добавление соединения селена в низких концентрациях в питательную среду обусловило более раннее

прорастание инокулята. Действие вещества на данном этапе можно рассматривать как «селеновый допинг» процесса прорастания. Возможно, активизируется ряд гидролитических ферментов, участвующих в прободении оболочек спор.

Изучение влияния селена на интенсивность и динамику споруляции микромицетов показало, что концентрации 10^{-4} — 10^{-6} г/л повлекли ослабление процесса на момент активного спороношения в контроле, хотя скорости роста мицелия превышали контрольные.

Результаты изучения воздействия селена на степень биосинтеза вторичных метаболитов микромицетов показали, что добавление в среду для ферментации низких концентраций селената натрия стимулирует выход антибиотиков (от 11 до 27% в сравнении с контролем).

Таким образом, в ходе исследований было показано, что соединения селена оказывают существенное влияние на онтогенез и разнообразные аспекты жизнедеятельности микромицетов.

О РОЛИ БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ В ТРАНСФОРМАЦИИ СЕЛЕНА В ЭКОСИСТЕМАХ

Ильина Г. В., Иванов А. И., Блинохватов А. Ф.
Пензенский государственный педагогический университет
Пензенская государственная сельскохозяйственная академия
440001, Пенза, ул. Лермонтова, 37
440014, Пенза, ул. Ботаническая, 30

Способность накапливать селен и трансформировать его по цепям питания является одной из важнейших функций базидиальных макромицетов в лесных экосистемах. Как показали ниши исследования этой

способностью обладают все изученные виды, однако выражена она у них не одинаково. По содержанию селена в плодовых телах макромицеты можно разделить на три группы:

1) виды, у которых содержание селена в плодовых телах превышает 10 мг/кг. Это — *Agaricus bisporus* (25,9 мг/кг); *Amanita muscaria* (16,24 мг/кг); *Boletus erythropus* (18,64 мг/кг); *Marasmius oreades* (17,8 мг/кг); *Russula delicata* (11,96 мг/кг); *Suillus luteus* (11,89 мг/кг);

2) виды, у которых содержание селена в плодовых телах колеблется от 5 до 10 мг/кг: *Amanita citrina* (6,09 мг/кг); *Agaricus campester* (5,43 мг/кг); *Coprinus cibarius* (5,4 мг/кг); *Coprinus comatus* (8,4 мг/кг); *Leccinum scaberrimum* (9,9 мг/кг);

3) виды, у которых содержание селена в плодовых телах ниже 5 мг/кг: *Cortinarius triumphans* (1,47 мг/кг); *Hebeloma crustuliniforme* (4,7 мг/кг); *Pluteus atricapillus* (1,71 мг/кг).

Как показали, проводившиеся нами экспериментальные исследования селен стимулирует рост мицелия грибов и способствует процессу образования базидиом. При этом отзывчивость мицелиальных культур на селеновые добавки имеет видовую специфичность. Анализ степени накопления селена в мицелии некоторых видов агарикоидных грибов, выращенном

на обогащенной питательной среде показал, что в эксперименте значительная степень аккумуляции характерна для *Agaricus bisporus* и составляет $2,6 \times 10^{-4}\%$ от сухого веса при содержании селена в среде 10^{-6} г/л. Для других агарикоидных грибов обнаружены следующие показатели абсорбции селена из субстрата: *Pleurotus ostreatus* $-1,8 \times 10^{-4}$; *Agrocybe dura* — 6×10^{-5} ; *Lepista sordida* и *Collybia dryophila* — $5 \times 10^{-5}\%$ от сухого веса.

Способность базидиальных макромицетов накапливать селен имеет значение для экосистем, т.к. плодовые тела этих грибов активно поедаются личинками насекомых мицетофагов, слизнями и позвоночными животными. Данный факт позволяет предположить, что вынос селена из почвы макромицетами имеет большое значение для биогенного круговорота этого элемента в экосистемах и биосфере в целом.

Содержание селена в плодовых телах грибов определялось флюориметрическим методом с реактивом 2,3-диаминонафталином на приборе «Флюорат 02-3М».

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ГРИБА *PANUS TIGRINUS* ВКМ F-3616 D

Кадималиев Д. А., Ревин В. В., Атыкян Н. А.

Мордовский государственный университет имени Н.П.Огарева
Биологический факультет, кафедра биотехнологии
430019, Саранск, ул. Ульянова, д. 26^б

В природных условиях биodeградация лигнина инициируется и осуществляется посредством окислительных ферментов, выделяемых грибами в окружающую среду. Эти ферменты образуют так называемый лигнолитический комплекс, включающий лакказу, пероксидазы и вспомогательные перекись-генерирующие ферменты. Роль и место этих ферментов в разрушении лигнина неоднозначна и широко дискутируется в литературе. Для ряда грибов ключевым ферментом являются лакказы, для других — лигнинпероксидаза, для третьих — Mn-пероксидаза. Лигнолитические ферменты в последние годы привлекают внимание в связи с возможностью их использования в биомодификации и биоконверсии лигноцеллюлозных отходов, биоочистке сточных вод и почв от лигнинсодержащих загрязнений и токсических веществ. В связи с этим актуальным является поиск продуцентов и получение стабильных лигнолитических ферментов.

Работа посвящена изучению ферментов лигнолитического комплекса выделенного на кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета гриба *Panus tigrinus* ВКМ F-3616D, которые играют важную роль в процессах биотрансформации и биodeградации лигнина.

Было выявлено, что данный гриб продуцирует комплекс пероксидаз, в том числе Mn-пероксидазу и

секреторную пероксидазу растительного типа. Выделенная секреторная пероксидаза имеет оптимум pH 7,0 и два температурных оптимума. Наиболее специфичным субстратом, как и для растительных пероксидаз, для нее был гваякол. При этом предварительные данные показывают, что она марганец-независимая и по свойствам близка к растительным пероксидазам. Исследования по воздействию фермента на лигноуглеводный комплекс древесины и другие лигноцеллюлозные субстраты показали, что при оптимальных условиях в присутствии перекиси водорода он способен окислять лигнин. Однако вопрос участия этого фермента в биodeградации лигнина *in situ* остается дискуссионным.

Ключевым же ферментом в деградации лигнина у данного гриба, по-видимому, является лакказа. Продуцируемая грибом лакказа имела оптимум pH 7,0 и температуры — 65°. Полученные предварительные результаты по субстратной специфичности выделенной лакказы указывают на то, что гриб, вероятно, синтезирует несколько изоформ фермента, обладающих различной субстратной специфичностью и относящихся к желтым оксидазам.

Таким образом, выделенный нами гриб продуцирует комплекс ферментов способных участвовать в процессах биотрансформации и биомодификации разнообразных лигнинсодержащих субстратов.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕССОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ДРЕВЕСНОГО СЫРЬЯ, ОБРАБОТАННОГО ГРИБОМ *PANUS (LENTINUS) TIGRINUS*

Кадималиев Д. А., ШUTOVA В. В., Ревин В. В.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева
430019, Саранск, ул. Ульянова, д. 26^б, биологический факультет

Древесностружечные материалы, изготавливаемые по традиционной технологии с использованием синтетических смол, обладают повышенной токсичностью. В связи с этим проблема создания экологически чистых плит весьма актуальна. Предлагается использовать для предварительной обработки древесных субстратов высшие базидиальные грибы, относящиеся к грибам белой гнили. Базидиомицеты *Panus tigrinus*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* обладают высокой активностью лигнолитических ферментов, которые, воздействуя на лигнин древесины, освобождают высокорекреационноспособные функциональные группы. Данные группы способны при последующем горячем прессовании вступать во взаимодействие друг с другом, а также с другими биополимерами древесины и биомассы гриба, образуя полимерную сетку.

В нашей работе были исследованы физико-механические свойства древесных пластиков, обработанных лигнолитическим грибом *Panus (Lentinus) tigrinus* 317 (ВКМ F-3616 D).

Твердофазное культивирование гриба на опилках березы и сосны снижает содержание лигнина и целлюлозы в субстратах, причем содержание лигнина уменьшалось быстрее. Рост на березовых опилках и разрушение их основных компонентов были более интенсивными.

Показано, что при изготовлении древесных пластиков их физико-механические свойства зависят от длительности и условий обработки грибом *L. tigrinus*. Обработка древесных отходов грибом позволяет повысить прочность получаемых плит более, чем в 5 раз по сравнению с изготовленными из необработанных опилок. Такой эффект связан с тем, что под действием лигнолитических ферментов гриба при твердофазном культивировании в лигнине древесины происходят перестройки с высвобождением функциональных групп, увеличивающих связующие свойства сырья.

Подбирались условия получения инокулята *L. tigrinus* для обработки древесных опилок. Показано, что использование трехсуточного инокулята позволяет получить большее содержание белка в обработанном субстрате. Целесообразно добавлять в питательную среду лигнинсодержащие отходы — целлюлигинин (отход гидролизной промышленности) и технический лигносульфонат натрия (отход целлюлозно-бумажной промышленности).

Важным моментом получения древесностружечных плит является установление параметров прессования биообработанного сырья. Определены оптимальные значения давления, температуры и прессования биопластиков.

Таким образом, показана возможность получения экологически безопасных биопластиков из древесных отходов с использованием микроскопических грибов.

СВЯЗЬ ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ У *PENICILLIUM FUNICULOSUM* KM MГУ 433

Куплетская М. Б., Красильникова Е. Н., Нетрусов А. И.

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

Глюкозооксидазу (ГО, КФ 1.1.3.4.) широко используют в медицинской диагностике и пищевой промышленности. На кафедре микробиологии МГУ выделен перспективный продуцент внеклеточной ГО *P. funiculosum* 433 и разработаны условия, обеспечивающие синтез грибом ГО до 160 ед/мл. Установлена связь накопления внеклеточной ГО с количеством каталазы в мицелии. Поскольку каталаза является железопорфирином, образование внеклеточной ГО зави-

сит от содержания железа в среде. При дефиците железа гриб не способен синтезировать достаточное количество каталазы для разрушения перекиси водорода, которая образуется под воздействием ГО. И тогда, во избежание отравления перекисью водорода, гриб усиленно выделяет ГО во внешнюю среду. При добавлении железа содержание каталазы в мицелии увеличивается, и образование внеклеточной ГО резко снижается.

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ ЦИКЛОСПОРИНА А

Ланчинская О. А., Львова Н. А., Терехова Л. П., Федорова Г. Б.

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе РАМН
119992, Москва, ул. Б.Пироговская, д. 11

В результате скрининга высокоспецифичных иммуносупрессоров типа циклоспорина была выделена культура гриба из рода *Acremonium* № 4699, образу-

ющая комплекс метаболитов с выраженным действием в отношении *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* и дрожжей рода *Rhodotorula*. Тест-организмы, отселек-

тированные по чувствительности к циклоспоринолу А, позволили выявить подавляющее действие антибиотика в концентрации 3–5 мкг/мл.

Была изучена хроматографическая подвижность антибиотического комплекса в экстрактах из культуральной жидкости и мицелия (хлороформ, этилацетат, ацетон) методом ТСХ с химическим проявлением реактивом Урка, а также биоавтографией с использованием нескольких систем растворителей и показано совпадение значений Rf основного компонента комплекса со стандартным образцом циклоспорина А (Sandoz). Из концентрированных экстрактов путем осаждения комплекса (эфиром, гептаном, гексаном) были получены опытные образцы антибиотика. Основной компонент антибиотического комплекса по физико-химическим свойствам был идентифицирован как циклоспорин А (ВЭЖХ, кислотный гидролиз, ИК-спектрометрия).

По морфологическим и физиологическим свойствам штамм продуцента № 4699 был идентифицирован как *Acremonium charticola* (Lindau) W. Gams. Таким образом, несовершенные грибы из рода *Acremonium* могут служить объектом поиска видов и штаммов, синтезирующих циклоспорин, наряду с известными продуцентами *Trichoderma* и *Tolyposcladium*.

По морфологическим и физиологическим свойствам штамм продуцента № 4699 был идентифицирован как *Acremonium charticola* (Lindau) W. Gams. Таким образом, несовершенные грибы из рода *Acremonium* могут служить объектом поиска видов и штаммов, синтезирующих циклоспорин, наряду с известными продуцентами *Trichoderma* и *Tolyposcladium*.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ КСИЛАНАЗЫ И ЦЕЛЛЮЛАЗЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИМ ГРИБОМ *TRICHODERMA VIRIDE* 44-11-62/3К

Ларина Л. Н., Павлова Н. М., Шишкова Э. А.,
Петрова Н. Т., Полетаева О. А., Бравова Г. Б.
НТЦ «Лекбиотех»

117246, Москва, Научный пр., д.8

При технологии производства целлюлолитических ферментов и, в частности, гемицеллюлаз, которым отводится важная роль при переработке растительного сырья, переработке растительного сырья, одной из важнейших задач является подбор оптимальных по составу питательных сред и условий культивирования продуцента

Известно, что микроскопические грибы *Trichoderma viride* являются продуцентами активного комплекса целлюлолитических ферментов, а также имеются сообщения о способности образовывать данным грибом внеклеточные ксиланазы.

Нами было изучено влияние отдельных компонентов питательной среды и условий культивирования на биосинтез ксиланазы и целлюлазы грибом *Trichoderma viride* 44-11-62/3К. С помощью метода математического планирования проведены работы по подбору предпочтительного варианта питательной среды и способа ее приготовления. Установлено, что максимум ксиланаз образуется на среде, содержащей пшеничные отруби, порошок целлюлозы, кукурузный экстракт и минеральные соли. При этом наряду с высоким уровнем ксиланазы в среде синтезировалась также целлюлаза. Были исследованы закономерности биосинтеза ферментов на разработанной среде. Установлено, что максимальный уровень обоих ферментов достигается на 5 сутки роста при температуре культивирования 28–30°C.

Изучая влияние начальной рН среды на уровень накопления ферментов при культивировании гриба *Trichoderma viride* 44-11-62/3К, установлено, что максимальный синтез ксиланазы с активностью 110 ед/мл наблюдается при начальном рН среды 6,0–6,5; при этом активность целлюлазы составляет 34 ед/мл. Измене-

ние величины рН среды в кислую сторону приводит к значительной задержке биосинтеза ксиланазы и отрицательно сказывается на уровне накопления ксиланазы. В то же время отмечено, что максимальное накопление целлюлазы происходит при более низком значении рН, равном 5,0–5,5. При этом активность целлюлазы составляет 40 ед/мл, активность ксиланазы — 85 ед/мл.

Показано, что аэрация оказывает влияние на биосинтез обоих ферментов. Однако установлено, что для биосинтеза целлюлазы потребность культуры в растворенном кислороде больше, чем для биосинтеза ксиланазы.

Замечено, что добавление в среду на начальных стадиях культивирования повышенных концентраций целлюлозы не позволяет получить максимальную активность целлюлолитических ферментов. Учитывая, что синтез ферментов контролируется путем кatabолитной репрессии, предложен способ дробного внесения целлюлозы на стадии интенсивного образования биомассы. При таком способе культивирования удалось значительно увеличить активность не только целлюлазы — на 25–30% при незначительной увеличении активности ксиланазы.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности ведения направленного биосинтеза и получения комплекса ферментов с различным соотношением ксиланазы и целлюлазы путем изменения условий культивирования.

Проведенные исследования легли в основу технологии получения ферментного препарата «Ксилозим», не уступающего по уровням активности ксиланазы и целлюлазы известным аналогам, например препарата «Пентопан» фирмы «Ново Нордиск».

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИДОВ РОДА TRICHODERMA ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ОТХОДОВ ЛЕСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Махова Е. Г., Громовых В. С., Рязанова Т. В.

Сибирский государственный технологический университет
660049, Красноярск, пр. Мира, д. 82

Одной из важнейших экологических проблем по-прежнему является обезвреживание и утилизация отходов лесной промышленности. В связи с этим нами исследовалась возможность биоконверсии одубины коры лиственницы и гидролизного лигнина для получения ферментативной массы с целью ее дальнейшего использования в качестве биопрепарата. Способность к деструкции лигнина и целлюлозы исследована у широкого круга микроорганизмов, различных, как по систематическому положению, так и по эколого-трофической принадлежности. В настоящее время ведется поиск микроорганизмов, которые были бы способны к утилизации этих труднодоступных материалов и являлись активными антагонистами фитопатогенов с целью создания биопрепаратов для защиты растений.

Была изучена возможность роста на гидролизном лигнине и одубине коры лиственницы аборигенных штаммов-антагонистов из рода *Trichoderma*, выделенных из почв лесопитомников Средней Сибири. Для работы были отобраны штаммы четырех видов, проявлявшие наибольшую антагонистическую активность к фитопатогенам семян хвойных: *T.asperellum Samuels et al. штамм У*, *T.asperellum Samuels et al. штамм МГ*, *T.asperellum Samuels et al. штамм О-97*, *T.koningi Rifai штамм МК*, *T.harsianum Rifai штамм 10-99*, *Trichoderma sp. штамм 01-00*. С целью увеличения реакционной способности исходное сырье подвергали механической и гидродинамической обработке.

Установлено, что исследуемые грибы способны к быстрой колонизации субстратов и спороношению. Результаты анализа содержания веществ лигниновой природы и трудно- и легкогидролизуемых полисахаридов показали, что штаммы грибов в различной степени утилизируют данные компоненты растительно-

го сырья. При этом одубина коры лиственницы является более доступным субстратом, а ее дополнительное измельчение значительно увеличивает степень деструкции, в том числе и лигниновых веществ. Такая обработка приводит к увеличению накопления биомассы, а у некоторых штаммов и к интенсивному спороношению. Добавка к одубине минеральных солей 3% от абсолютно сухой навески сырья при степени помола 33°ШР и начальной влажности субстрата 80% приводит к наибольшей деструкции субстрата. При лабораторном регламенте штамм *T.koningi* (МК) через 15 суток ферментации одубины приводит к биоконверсии 59% лигниновых веществ, 19% целлюлозы, 37% гемицеллюлоз и вызывает убыль массы субстрата 25%; через 25 суток ферментации биоконверсия гидролизного лигнина составляет соответственно 15.2%, 1%, 2% и убыль массы 7%. Остальные виды утилизируют лигниновые компоненты только от 9 до 14%. При этом установлен факт накопления азотсодержащих веществ в ферментативной массе, а также отмечен синтез гуминовоподобных веществ. У штамма *T.asperellum* (МГ), по сравнению с *T.koningi* (МК), при биоконверсии используемых субстратов выявлена большая активность синтеза гуминовоподобных веществ, соответственно 14.3% и 10.6%. Проверка фитотоксичности субстрата после ферментации, проведенная на семенах лиственницы, показала отсутствие угнетающего действия на их развитие. При этом эффективность действия препарата против возбудителей фузариозов семян сохраняется в течение 2 месяцев.

Проведенные исследования показывают перспективность использования грибов рода *Trichoderma* для биоконверсии древесных отходов и использования ферментативной массы (биопрепарата) в борьбе с корневыми гнилями хвойных пород.

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИХОТЕЦИНА

Никитина М. Б., Ритов В. Б.

Институт биотехнологии
117246, Москва, Научный проезд, д.8

Технология получения препаратов на основе антибиотика трихотецина, продуцируемого дейтеромицетом *Trichothecium roseum*, требует быстрого и точного метода определения количественного содержания антибиотика в пробах и образцах. С этой целью разработан и успешно апробирован инструментальный метод количественного определения трихотецина путем высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления. Весь комплекс методических приемов от экстракции антибиотика до элюции на колонке с обращенной фазой выполняется в течение 15 минут против 48 часов, в течение которых определяется содержание трихотецина в настоящее время. При этом важно, что возрастают точ-

ность определения и чувствительность метода: минимально детектируемое количество антибиотика составляет 0,01 мкг. Кроме того, предложенный способ позволяет одновременно по стандарту вести тест на подлинность.

Таким образом, обладая рядом существенных преимуществ, разработанный метод позволяет вести массовые серии анализов и легко поддается автоматизации, что важно для промышленного производства препаратов трихотецина, требующего постоянного контроля содержания антибиотика при его биосинтезе и последующих технологических операциях. Он также удобен при мониторинге трихотецина в объектах окружающей среды.

НОВАЯ СРЕДА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ТРИХОДЕРМИНА

Никитина М. Б., Савицкая Г. А.

Институт биотехнологии

117246 г. Москва, Научный проезд, д.8

Производство и применение биопрепарата «триходермин» для защиты растений от болезней требует постоянного совершенствования питательных сред для культивирования продуцента — дейтеромицета из рода *Trichoderma*. Для получения биопрепарата с высокой антагонистической и гиперпаразитической активностью необходимо чередование способов культивирования и применение некоторых специальных приемов, для чего следует использовать сочетания рецептур для погруженного и поверхностного выращивания. Целью работы был подбор среды для твердофазного культивирования.

Использовано 10 штаммов грибов из рода *Trichoderma*. Критерием пригодности субстратов служил титр полученных на них физиологически зрелых спор гриба и время достижения эффективных титров. В результате подбора компонентов предложена питательная среда, включающая 70% подсолнечной лузги, солодовые ростки и отруби. Среда представляет собой рыхлый сыпучий субстрат и пригодна для заполнения аппаратов для твердофазной ферментации. В течение 72 часов титр спор на ней достигал 12–26 млрд в г в зависимости от штаммовых особенностей.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ И БРОЖЕНИЕ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ

Патрушева Е. В., Велигонова Н. В.

Ростовский государственный университет

344006, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, д. 105

Отношение дрожжей к температуре брожения неодинаково и зависит от их вида и расы. В технологии виноделия необходим оптимальный выход продуктов обмена этих микроорганизмов, в частности этилового спирта, летучих и титруемых кислот. Накопление этих метаболитов связано с продолжительностью определенных фаз в развитии культуры, поэтому эти процессы необходимо изучать одновременно.

Для наблюдения за развитием дрожжевых популяций *Saccharomyces cerevisiae* var. *vini* производственных рас С-9 и ИВ-АД рассматривали кривые роста данных культур в периодической системе на виноградном сусле (10° Б, рН 5,5, титруемая кислотность 0,75 г/л) при температурах 15° С и 25° С, являющимися крайними границами оптимума для винных дрожжей.

Отмечено, что лаг-период развития культуры расы С-9 составил 2 часа при 25° С и 4 часа при 15°С. Максимальная скорость роста популяции расы ИВ-АД наблюдалась через 1 час культивирования при 25°С и через 3 часа при 15 ° С. При более низкой температуре происходило снижение показателя максимальной скорости роста в 2,5 и 1,6 раза у рас С-9 и ИВ-АД соответственно. Также при снижении температуры культивирования во всех вариантах наблюдалось удлинение lg-фазы (в 2,7 раза у расы С-9 и в 2,9 у расы ИВ-АД). Фаза замедленного роста при 15°С наступала через 73 часа у расы С-9 и через 80 часов у расы ИВ-АД, тогда как при 25° С она начиналась через 25–27 часов в обоих случаях. При температуре культивирования 25° С обе расы вышли на

стационарную фазу одновременно (через 48 часов культивирования), а при 15°С — к 95 и 115 часу соответственно.

Как по количеству клеток, так и в весовом отношении, урожай был выше при 25° С и составил 47,5х10 кл/мл и 2,866 г/л (раса С-9), а у расы ИВ-АД эти показатели были в 2,4 и 2,1 раза ниже. При температуре 15°С максимальная суммарная численность клеток была ниже в 33,9 и 16, 2 раза у обеих рас соответственно, выход биомассы был в среднем в 2 раза ниже, чем при 25° С культивирования.

Продолжительность брожения при 25° С и 15° С культивирования различалась. С понижением температуры этот процесс удлинялся в среднем в 1,3 раза. При брожении расы С-9 при 15° С выделилось углекислоты в 2,6 раз меньше, чем при культивировании при 25° С. В тех же условиях раса ИВ-АД выделяла одинаковое количество СО₂.

В данном эксперименте максимальное накопление этанола, титруемых и летучих кислот было отмечено при культивировании расы С-9 при 25° С (40,9 г/л спирта, 2,775 г/л титруемых кислот и 0,396 г/л летучих кислот), тогда как раса ИВ-АД продуцировала этанол в количестве 33,0 г/л, титруемые кислоты — 2,700г/л, а летучие — 0,267 г/л.. При температуре 15° С обе расы образовали в 1,6 раза меньше спирта, показатели кислотности были ниже в среднем в 1,3 раза меньше.

Таким образом, анализ роста производственных рас винных дрожжей показал, что оптимальной температурой культивирования данных рас дрожжей может являться 25° С.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОГО СПОСОБА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕНОГАШЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКЗО-ЛИПАЗЫ ИЗ *RHIZOPUS COHNII*

Пичко В. Б., Айзенберг В. Л., Григорчак Н. Н., Петренко Ю. П., Беренштейн Б. Л., Москаленко Л. Г.

Украинский государственный университет пищевых технологий
01033, Украина, г. Киев, ул. Владимирская, 68

В настоящее время для пенорегулирования в процессе ферментации при производстве биологически активных веществ наибольшее распространение получили химические методы пеногашения с применением синтетических пеногасителей.

Эффективность пеногашения зависит от содержания пеногасителя в культуральной жидкости (КЖ) и от степени его дисперсности. Кроме того, расходы пеногасителей на предприятиях микробиологической промышленности отражаются на себестоимости конечного продукта.

Высокая степень дисперсности пеногасителя в КЖ может быть достигнута применением эмульсий пеногасителей. Основным недостатком известных методов эмульгирования являются неудовлетворительные характеристики получаемых эмульсий.

На кафедре биотехнологии микробного синтеза Украинского государственного университета пищевых технологий разработан способ получения эмульсий пеногасителей, заключающийся в смешивании компонентов (пеногасителя, эмульгатора и воды) с помощью вращающихся ферромагнитных частиц под воздействием переменного встречно-направленного электромагнитного поля с индукцией 0,1 Тл и частотой 50 Гц. Указанные параметры процесса обеспечи-

ваются использованием линейного индукционного вращателя (ЛИВ).

В отделе физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины получен штамм гриба *Rhizopus cohnii* — продуцент экзо-липазы.

При культивировании *Rhizopus cohnii* в ферментёре на среде, содержащей соевую муку, наблюдается сильное вспенивание жидкости, мешающее нормальному ведению процесса, снижающее коэффициент заполнения ферментёра и, следовательно, выход готовой продукции.

Исследование эффективности эмульсий, пеногасителей проводили на образцах 10 — 50%-ных эмульсий пропинола и 2,5 — 10%-ных эмульсий ниогена, полученных обработкой в ЛИВ.

Наибольшая эффективность пеногашения среды при культивировании продуцента липазы отмечается при использовании 20% -ой эмульсии пропинола и 5%-ой эмульсии ниогена. Установлено снижение расхода синтетических пеногасителей при получении фермента. Обработанные с помощью ЛИВ эмульсии характеризовались высокой устойчивостью к расслоению оставаясь стабильными в течение месяца.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *PENICILLUM CHRYSOGENUM* ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КЛЕЕВЫХ КОМПОЗИЦИЙ

¹Ревин В. В., ¹Кадималиев Д. А., ²Грошев В. М.

¹Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева, Биологический факультет
430019, Саранск, ул. Ульянова, д. 26^б

²ОАО «Биохимик»

Саранск, ул. Васенко, д. 15^а.

Производство антибиотиков сопряжено с образованием большого количества отходов, причем значительную их часть составляют мицелиальные массы. Методы утилизации этого вида отходов нельзя назвать рациональными ни с экономической, ни с экологической точек зрения. Однако анализ химического состава мицелиальных отходов показывает наличие в них соединений, традиционно используемых в производстве биоклеев. Но сам мицелий является довольно устойчивой структурой. Белки, входящие в его состав стабилизированы, за счет связей с другими соединениями. А адгезивные свойства биополимеров во многом определяются взаимным расположением и взаимодействием функциональных групп макромолекул. Для раскрытия реакционно-способных групп белков необходимо проводить модификацию мицелия, то есть частичное разрушение его структуры. Модифицированный мицелий можно будет использовать в качестве дополнительного сырья для клеевой промышлен-

ности, что позволит снизить себестоимость биоклеев.

Исследованы химический состав мицелия *P. chrysogenum*, продуцента пенициллина производимого на ОАО «Биохимик» (Саранск), подобраны условия модификации сырого и сухого мицелия для придания ему клеящих свойств.

В мицелие содержится около 30% белка, 2% сахаров, 7% клетчатки и 2% жира (в пересчете на сухое вещество). Причем эти показатели зависят от возраста и физического состояния мицелия и могут колебаться.

Адгезивные свойства мицелия зависят как от природы и концентрации модификатора, так и от времени и длительности обработки. Наиболее подходящими агентами оказались соляная кислота и натриевая щелочь в концентрациях 2-6%. Для приготовления клея за основу использовали низкомолекулярную фракцию гидролизата декстрана — отход микробиологического производства кровезаменителей, к которой в различных соотношениях добавляли пластификаторы, анти-

септики, сшивающие агенты и мицелий. Испытания показали, что использование модифицированного мицелия, лютерной воды и низкомолекулярной фракции декстрана позволяет получить клеевые композиции не уступающие по своим физико-механическим свойствам декстриновому клею, при более низкой себестоимости. Лучшие варианты клеевых композиций имели прочность склеивания 100 МПа при использовании древесины и 1,5 Н при использовании бумаги.

Показано также, что модифицированный мицелий гриба можно использовать в качестве дополнительного сырья при производстве костного клея. Изготовленные таким образом композиции были применены для производства клеевой ленты на бумажной основе и для склеивания древесины и бумаги. Испытания показали, что использование модифицированного сырого мицелия в качестве добавки к костному клею позволит снизить его себестоимость на 20—30%.

МИТОСПОРОВЫЕ ГРИБЫ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИННО-КОФЕРМЕНТНЫХ ПИЩЕВЫХ И КОРМОВЫХ ДОБАВОК И ВИТАМИНОВ

Супрун С. М., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Харкевич Е. С.,
Цибульская М. И., Королев П. Н.

Институт биохимии им.А.В.Палладина НАН Украины
01601, Киев, ул. Леонтовича, д. 9.

ГУП Государственный научно-исследовательский институт «Витаминов»
117246, Москва, ул. Научный проезд, д. 14 а.

Биомасса грибов является прекрасным источником многих природных биологически активных веществ, таких как белки, витамины, жирные кислоты, а также соединения, которые редко встречаются у других микроорганизмов (убихинон Q₁₀). Некоторые из этих соединений обладают антиоксидантными или антимуtagenными свойствами. Грибной белок по составу аминокислот не уступает животному, что делает грибную биомассу ценным сырьем для получения пищевых и кормовых добавок. В процессе проведенной нами работы отобраны и селекционированы атоксигенные штаммы грибов, продуцирующие избыточное количество витаминов и некоторых коферментов: *Fusarium sambucinum* — продуцент комплекса водорастворимых витаминов (B₁, B₃, B₅, B₆) и их коферментных форм, в том числе убихинона Q₁₀, мицелий которого содержит значительное количество глюканов (74 мг/г с.в.); *Mycelia sterilia* (white) — продуцент белково-ферментного комплекса, некоторых витаминов; *Penicillium sclerotiorum* — сверхпродуцент каротиноидов; *Penicillium vitale* — продуцент ФАД. Изучены физиолого-биохимические особенности штаммов — продуцентов, отработаны условия их культивирования. На основе штаммов проду-

центов *Fusarium sambucinum*, а также комбинации *Fusarium sambucinum* и *Penicillium sclerotiorum* в полупромышленных условиях разработаны экологически чистые безотходные технологии получения пищевых и кормовых добавок. При культивировании на растительном сырье этих штаммов в течении 40-48 часов получен выход белка до 42%. Полученные добавки содержат не только комплекс витаминов, но и незаменимые аминокислоты (лизин, триптофан, аргинин), ненасыщенные жирные кислоты и минеральные компоненты, необходимые организму животных и человека. Полученные добавки обладают не только биостимулирующим, но и защитным лечебно-профилактическим действием по отношению к возбудителям инфекционных и инвазионных заболеваний, что показано при испытании их на шелкопряде и рыбах.

Изучены условия биосинтеза СоА и ФАД штаммами —продуцентами среди грибных и бактериальных культур. При добавлении в реакционную смесь предшественников синтеза коферментов ФАД и СоА выход их значительно повышался, что дало возможность разработать метод получения и очистки индивидуальных соединений.

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНА И КРАХМАЛА

Сычугова О. В., Колесникова Н. Н., Попов А. А.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4

Создание полимерных материалов, способных разрушаться под действием микроорганизмов, способствует решению проблемы утилизации полимерных отходов. Большинство используемых синтетических полимеров не восприимчивы (либо восприимчивы в малой степени) к действию микроорганизмов. Смешение синтетических полимеров с природными — часто для этого используют крахмал — позволяет получать материалы,

способные подвергаться биодеструкции.

В качестве промежуточных продуктов биохимических процессов, инициируемых микроорганизмами, образуются органические кислоты (в том числе, щавелевая кислота), разрушающе действующие на полимерный материал.

В настоящей работе изучали смесевые композиции на основе сополимера этилена и винилацетата (СЭВА)

и термопластичного крахмала (ТПК). Методом дифференциальной сканирующей калориметрии проведено исследование образцов разного состава до и после воздействия шавелевой кислотой, а также музейными штаммами *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*.

На термограммах образцов наблюдали эндотермический пик, величина и температура максимума которого зависела от содержания винилацетатных звеньев в сополимере. При минимальном их содержании температура максимума пика плавления составляла около 90°C. Этот пик обусловлен плавлением кристаллических структур, образованных участками полиэтиленовых звеньев. С увеличением содержания ТПК и винилацетатных звеньев в сополимере степень кристалличности исходных образцов уменьшается.

Уже на начальных стадиях воздействия микроорганизмов (17 суток) наблюдается увеличение степени кристалличности полимера. На термограммах образцов появляется низкотемпературный пик (60 — 70°C), возрастающий по мере увеличения времени воздействия микроорганизмов. Так как биодegradация начинается с аморфных областей, в ходе ее увеличивается подвижность макромолекул, наблюдается докристаллизация полимера и появление менее совершенных упорядоченных образований.

Тенденция к увеличению степени кристалличности образцов наблюдалась и при воздействии на них шавелевой кислотой. Изучение структурных изменений полимерных материалов позволяет оценивать их способность к биодegradации.

ВОЗМОЖНОСТИ УТИЛИЗАЦИИ МИКРОМИЦЕТАМИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНА

Сычугова О. В., Лихачев А. Н.

Институт им.Н.М.Эмануэля РАН

119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4

МГУ им.М.В.Ломоносова

119899, Москва, Воробьевы горы, д. 1, кор. 12

Большую значимость в последние десятилетия приобретают исследования, направленные на создание полимерных материалов и их модификаций, утилизация которых возможна под воздействием микробиоты.

Целью наших исследований являлось изучение вероятности поражения смесей сополимера этилена и винилацетата и термопластичного крахмала видами микромицетов, рекомендованных ГОСТ 9.049-91 для испытания на грибостойкость полимерных материалов и их компонентов.

В опытах были использованы тест-культуры из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium variotii*, *Penicillium brevi-compactum*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma viride*, *Stachybotrys sp.*, *Stachybotrys chartarum*.

Для оценки на стойкость к воздействию плесневых грибов были использованы пленочные образцы сополимера этилена и винилацетата (СЭВА) доля винилацетата в сополимере варьировалась в пределах от 5-7 до 26-30 масс.% с добавлением 10 масс.% термопластичного крахмала (ТПК), полученного на основе нативного кукурузного крахмала посредством набухания в растворе (пластификаторе) с последую-

щей термомеханической обработкой.

Предварительно были определены жизнеспособность культур и процент прорастания конидий на жидких и агаризированных средах Гетчинсона, Чапека, пивное сусло. Одновременно проведено изучение культурально-морфологических признаков на данных средах.

Экспозиция полимерных материалов, зараженных тест-культурами сухим способом и выдерживаемых при различной влажности, создаваемых с помощью насыщенных солей в герметичных камерах, выявила их способность осваивать образцы субстрата в зависимости от относительной влажности воздуха (w,%).

Наиболее агрессивными показали себя штаммы следующих видов: *Aspergillus niger*, *Penicillium variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride*.

Наблюдаемый у них рост и развитие морфологических структур, приводящих к формированию спороношения на полимерном материале показывает большую вероятность участия данных видов грибов в биодеструкции смесей СЭВА и ТПК. Это дает возможность отобрать наиболее активные виды и штаммы при последующих пассажах на смесях СЭВА и ТПК и использовать их для разработки регламента по их утилизации.

ГРИБНАЯ КСИЛАЗА — СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Удалова Э. В., Рышкова Т.М., Никитина М. Б., Громова Г. А.

Институт биотехнологии

117246, Москва, Научный пр., д.8

Грибную ксиланазу, полученную биотехнологическим способом при глубинном культивировании *Trichoderma viride*, характеризовали по ферментативной активности по отношению к природному субстрату —

ксилану на основании регистрации продуктов его расщепления различными модификациями методов Шо-модьи-Нельсона и реакционных систем, имеющих в своем составе 3,5-динитросалициловую кислоту (ДНС).

Установлено, что при корректном сравнении парно методик Шомодьи-Нельсона и ДНС, приведенных к эквивалентным концентрациям субстратов, компонентов реакционных систем и растворов фермента, значения активности по методу ДНС относятся

к таковым, полученным методом Шомодьи-Нельсона, как 5 : 1.

Разработана модификация ДНС-метода, отличающаяся простотой выполнения, быстротой и хорошей воспроизводимостью результатов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОДУКТОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER*

Унрод В. И., Лега Ю. Г., Солодовник Т. В.

Черкасский государственный технологический университет
Украина, г. Черкассы, 18006, бульвар Шевченко, 460

В последние годы возрос интерес к хитину, хитозану и их производным в связи с распространенностью в природе этих полисахаридов, необычными свойствами (биосовместимостью и биодegradуемостью) и возможностью применения в различных областях народного хозяйства. Основным сырьевым источником для получения хитинсодержащих продуктов являются панцири ракообразных. Однако, в последнее время наблюдается уменьшение добычи ракообразного сырья — основного источника хитина, повышение количества тяжелых и радиоактивных металлов в ракообразных, повышение стоимости хитина. В связи с этим стал актуальным вопрос нахождения доступных сырьевых источников для получения хитина и его производных. Всё большее внимание исследователей привлекает такой сырьевой источник как грибы. Хитин содержится в грибах, что было показано еще в 1896 году Гильсоном. Хитин принято считать основным структурным биополимером клеточной стенки грибов. Он выполняет армирующую роль и обеспечивает механическую прочность, но отсутствие жесткой связи между микрофибриллами позволяет сохранять определенную эластичность клеточной стенки. Содержание хитина у низших грибов в зависимости от условий их культивирования находится в пределах от 0,2% до 26,2%. Именно этим и объясняется интерес к мицелиальным грибам, как хитинсодержим источникам, а в особенности к тем, которые являются отходами биотехнологических производств органических кислот, ферментов, антибиоти-

ков. Мицелий гриба *Aspergillus* как источник для получения хитинсодержащих продуктов, представляет интерес в регионах, прилегающих к заводам по производству лимонной кислоты. В процессе биотехнологического синтеза мицелий этого гриба является отходом производства. Содержание хитина составляет 18-20% от веса сухой биомассы. Для гриба *Aspergillus niger* характерно, что кроме хитина он содержит еще глюканы и меланины, которые *niger* невыгодно отделять от хитина, а можно получать так называемые хитинили хитозансодержащие комплексы (ХСК и ХанСК). Впервые итальянский ученый Музарелли с сотрудниками предложили использовать для получения таких комплексов грибницы нитевидных обрабатывая плесневых грибов, таких как *Allomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Choane* препаратом щелочи при температуре 118-130°C в течение 4-6 часов, их 30-50% водным соев. В результате такой обработки были получены хитозан-глюкановые комплексы, в которых глюкановая компонента по многим параметрам улучшает свойства хитозана. Получение этих комплексов из мицелиальных грибов целесообразнее и экономически выгоднее, чем получение чистого хитина или хитозана. В настоящее время данный способ постоянно совершенствуется и модифицируется в направлении поиска менее концентрированных и недорогих реактивов для обработки исходного мицелия, позволяющих получать комплексы стабильного состава, обладающие необходимыми свойствами.

БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ КОМПЛЕКСОМ МИКРОМИЦЕТОВ

Варнайте Р. Н.

Институт Ботаники

Литва, 2021, Вильнюс, Жалюю эжяру, д. 47

Растительные отходы сельского хозяйства и различных отраслей промышленности являются доминирующим видом потенциального растительного сырья для микробиологической конверсии.

Микромицеты играют огромную роль в биодegradации различных лигноцеллюлозных отходов и могут быть использованы для биотехнологических целей. Внимание исследователей привлекает микробиологическое разложение лигнина как возобновляемого сырья.

Изучена способность комплексов микромицетов из различных систематических групп утилизировать рас-

тительные отходы и обогащать их протеинами. В опытах были использованы следующие 10 комплексов микромицетов — продуцентов фенолоксидаз: 1) *Galactomyces geotrichum* — *Myrothecium verrucaria*; 2) *Galactomyces geotrichum* — *Sporotrichum pruinosum*; 3) *Myrothecium verrucaria* — *Sporotrichum pruinosum*; 4) *Dipodascus armillariae* — *Verticillium fungicola*; 5) *Papularia sphaerosperma* — *Fusarium redolens*; 6) *Papularia sphaerosperma* — *Mortierella verticillata*; 7) *Fusarium redolens* — *Fusarium oxysporum*; 8) *Chaetomium globosum* — *Mortierella verticillata*; 9) *Verticillium fungicola* — *Mortierella humilis*;

10) *Galactomyces geotrichum* — *Myrothecium verrucaria* — *Sporotrichum pruinosum*.

Установлено, что за 30 сут культивирования максимально содержание лигнина в соломе ржи снизил комплекс микромицетов *Galactomyces geotrichum* — *Myrothecium verrucaria* — *Sporotrichum pruinosum*. (в 1,3 раза по сравнению с контролем). Значительное снижение содержания лигнина (в 1,2 раза) было отмечено и после культивирования комплекса *Dipodascus armillariae* — *Verticillium fungicola*. В результате культивирования других выше упомянутых комплексов микромицетов содержание лигнина снизилось по сравнению с контролем в 1,2—1,0 раза.

При более длительном культивировании (60 сут) максимально (в 2,4 раза по сравнению с контролем) содержание лигнина снизил комплекс микромицетов

Galactomyces geotrichum — *Myrothecium verrucaria*.

Содержание целлюлозы, как и содержание лигнина, за 30 сут культивирования максимальна (в 2,4 раза по сравнению с контролем) снизил комплекс микромицетов *Galactomyces geotrichum* — *Myrothecium verrucaria* — *Sporotrichum pruinosum*.

При более длительном культивировании (60 сут) максимальное разложение целлюлозы (до 8,6%) было отмечено в варианте опыта с комплексом микромицетов *Galactomyces geotrichum* — *Myrothecium verrucaria* — *Sporotrichum pruinosum*.

Максимально (до 12,53%) растительные отходы озимой ржи были обогащены протеинами под действием комплексом микромицетов *Chaetomium globosum* — *Mortierella verticillata*. Это увеличение по сравнению с контролем составило 1,9 раза.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В СОЗДАНИИ ФОРМ ПШЕНИЦЫ С КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ

Веденева М. Л., Маркелова Т. С., Кириллова Т. В., Анисеева Н. В.

НИИСХ Юго-Востока

Саратов, ул. Тулайкова, д. 7

При создании форм и сортов пшеницы с комплексной устойчивостью к патогенам в лаборатории иммунитета НИИСХ Юго-Востока широко используются биотехнологические методы: эмбрикультура, культура пыльников, метод соматической изменчивости.

С целью переноса генов устойчивости к бурой ржавчине, мучнистой росе, пыльной головне от диких видов пшеницы (*Triticum dicoccum*, *T.* и др.) в мягкую пшеницу проводили межвидовые скрещивания *persicum*, *T. timopheevi*. Гибридные зародыши доращивали на искусственной питательной среде Мурасиге-Скуга. Для быстрого получения константных форм и закрепления признака болезнеустойчивости в потомстве использовали культуру пыльников. Пыльники брали из растений F2-F3, предварительно отобранных по устойчивости к болезням.

В лаборатории разработан метод оценки регенерантов на устойчивость к бурой ржавчине и мучнистой росе *in vitro*. Зеленые растения-регенеранты в стадии

одного листа инокулировались спорами грибов, полученных в климатической камере в изолированных условиях. Восприимчивые растения выбраковывались, а устойчивые доращивались до семян и использовались в качестве родоначальников болезнеустойчивых линий и сортов.

Для получения форм пшеницы, выносливых к гельминтоспориозной корневой гнили, использовали метод отбора *in vitro* соматических пшеницы, выносливых к токсину гриба *Helminthosporium sativum*. В качестве селекционирующего агента служил культуральный токсический фильтрат местных патотипов *Helminthosporium sativum*.

В результате исследований получены гомозиготные линии яровой и озимой мягкой пшеницы с комплексной устойчивостью к грибным болезням. Создан сорт озимой мягкой пшеницы Смуглянка с комплексной устойчивостью к бурой ржавчине, мучнистой росе, твердой головне, хлебному пилюльщику.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Велигонова Н. В., Патрушева Е. В.

Ростовский государственный университет

344006, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, д. 105

Дрожжевое производство заинтересовано, прежде всего, в максимальном накоплении биомассы сахаромицетов и, как следствие, к интенсификации процессов размножения. При этом обычно стремятся к тому, чтобы питательные среды, используемые в производстве, были полноценными по составу, хотя концентрация отдельных ее компонентов может быть понижена. Известно, что полноценность состава среды определяет скорость размножения дрожжей, а кон-

центрация питательных веществ — выход биомассы.

Целью настоящего исследования было изучение кривых роста, а также накопления биомассы и запасных питательных веществ культурой *Saccharomyces cerevisiae* производственной расы Р-20 на полноценной мелассной среде с концентрациями сухих веществ 12%, 13% и 14% по сахарометру. Также изучалась необходимость внесения в питательную среду 1% кукурузного экстракта в качестве источника биотина.

Отмечено, что на продолжительность экспоненциальной фазы и на наступление стационарной фазы варьирование концентраций сахара в питательной среде и добавление кукурузного экстракта не влияло.

В конце размножения число дрожжевых клеток было наибольшим на питательных средах с 13% и 14% сухих веществ (во всех вариантах этот показатель был одинаковым или близким и составил от 464 до 475 млн. кл/мл). Вес дрожжевых клеток в 100 мл культуры также принимал максимальные значения именно в этих условиях (вес 100 млрд. клеток составил 656 — 720 мг).

Отмечено, что концентрация сахара в среде не влияла на удельную скорость роста дрожжей, во всех вариантах в экспоненциальную фазу этот показатель равнялся 0,02 кл/ч.

Наибольшая валовая скорость роста культуры (7,87 кл/ч) наблюдалась при росте популяции дрожжей на

питательной среде с концентрацией сухих веществ 13%, добавление кукурузного экстракта на данный показатель не влияло.

Наблюдения показали, что количество клеток с гликогеном достигало максимума к 72 часам роста культуры во всех вариантах, к 30 часам культивирования 100% клеток на средах с 13% и 14% сухих веществ содержали волютин и липиды. Внесение в питательную среду 1% кукурузного экстракта на содержание гликогена, липидов и волютина влияния не оказывало.

Представляется целесообразным и экономичным культивирование дрожжей расы Р-20 на меласной среде с содержанием сухих веществ 13% (по сахарометру) без добавления кукурузного экстракта. В этих условиях выход биомассы и вес клеток является максимальным и в клетках накапливается достаточно большое количество запасных питательных веществ.
