

**Национальная академия микологии
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ**

Е.П. Теофилова, А.И. Алехин, Н.Г. Гончаров,
И. С. Мысякина, Я.Э. Сергеева

**Фундаментальные основы
микологии и создание
лекарственных препаратов
из мицелиальных грибов**

Москва
2013

УДК 577.3 + 602.6(075.8): 616.00

ББК 28.591.4 я73 +30.16я73

Ф94

Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов. Феофилова Е.П., Алехин А.И., Гончаров Н.Г., Мысякина И.С., Сергеева Я.Э. М.: Национальная академия микологии, 2013, 152 с.

Книга посвящена лекарственным препаратам из грибов, значению этих природных веществ для современной медицины, биотехнологиям их получения. Мицелиальные грибы рассматриваются не только с позиций их пищевой ценности, но и как источники для получения биологически активных веществ, которые можно использовать как иммуностимуляторы, адаптогены, антиканцерогены, как вещества, поддерживающие состояние гомеостаза и имеющие гиполиподемический, антисклеротический, противораковый, тромболитический, гипотензивный и антибиотический эффекты. Приведены современные данные о физиолого-биохимических особенностях грибов, необходимых для понимания их роли в создании лекарственных препаратов и в инновационных биотехнологических процессах. Дан краткий раздел о состоянии биотехнологии в России, инновациях в этой отрасли, связанных с последними теоретическими достижениями в микологии, в частности с ролью стресса, вторичного метаболизма и спорогенеза. Книга предназначена для микробиологов, микологов, медицинских работников, биотехнологов широкого профиля, научных сотрудников смежных дисциплин, студентов высших учебных заведений.

Рекомендовано к опубликованию Ученым советом ИНМИ РАН.

Издано в Российской Федерации в рамках программы и по рекомендации Ученого совета Национальной академии микологии

Рецензенты

Гарибова Лидия Васильевна – д.б.н., профессор
кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Бибикова Маргарита Васильевна – д.б.н.,
Государственный научный центр по антибиотикам.

ISBN 8-906062-07-9

©Национальная академия микологии, 2013

Предисловие

Книгу по грибным биотехнологиям в медицине, микологическим инновациям в лечении заболеваний человека давно ждут в России. Последние сборники и пособия, упоминающие некоторые биотехнологии на основе грибов, в том числе для медицинских целей, выходили за рубежом около 10 лет назад. В них уже тогда наметилась тенденция к освещению вопросов, прежде всего, геномики и регуляции метаболических процессов грибов – потенциальных продуцентов биологически активных веществ и еще в большей степени – родственных им модельных микроорганизмов. Вопросам физиологии и биохимии грибов, их взаимодействия с окружающей средой и другими организмами уделялось меньшее внимание. Конечные области приложения грибных биотехнологий в медицине лишь затрагивались зарубежными авторами. Глобальные изменения в фармацевтической индустрии и организации научных исследований, связанные с разработкой перспективных лекарств, отразились и на приходе новых грибных биотехнологий в клиническую медицину. Для многих врачей сегодня связь медицинской микологии и фармацевтики представляется лишь в виде клинических испытаний дорогостоящих зарубежных препаратов.

Это положение науки, клинической медицины и ожидаемых обществом инноваций по силам изменить лишь сотрудничеству ученых: исследователей фундаментальных вопросов микологии, биотехнологов и врачей. И здесь творческий коллектив ученых и специалистов, много лет работающих под руководством Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Елены Петровны Феофиловой, может служить примером для всех научных сообществ России. Уникальная атмосфера взаимодействия, сложившаяся в московском кластере Российской

академии наук, традиции сотрудничества и взаимной поддержки сотрудников ведущих академических учреждений, главных университетов и крупнейших клинических центров нашей страны продолжает приносить свои плоды. Научный задел и достижения отечественной биотехнологии и фармацевтики в конце XX века помогли современным ученым и специалистам удержать приоритеты России и проложить новым грибным препаратам дорогу в широкую клиническую практику.

Профессор Феофилова является не только крупным специалистом-микологом, биохимиком и биотехнологом. В течение многих лет она проводит большую образовательную и просветительскую работу, посвященную возможностям грибных биотехнологий в России и мире. Взгляды на значение грибов для современной экологии и цивилизации, изложенные ей в серии публичных лекций и докладов на наших микологических Съездах, конгрессах медицинских микологов, заседаниях Академии микологии, сыграли большую роль в формировании современных научных представлений нового поколения врачей и биологов России и СНГ. Заслуги Е.П. Феофиловой перед российской наукой в 2011 г. были отмечены высшей микологической наградой: медалью А.А. Ячевского Национальной академии микологии.

Настоящее издание продолжает серию ежегодных публикаций в рамках действующей с 2001 г. издательской программы Национальной академии микологии. После нескольких выпусков сборника «Микология сегодня», монографий по систематике и таксономии, генетике, экологии грибов, серий практических руководств, пособий и каталогов, издательский комитет Академии принял решение поддержать выпуск этой книги в 2013 г. Мы рекомендуем ее не только микологам и биотехнологам, но и врачам самых разных специальностей, фармацевтам и провизорам, студентам и сотрудникам медицинских и биологических вузов.

Президент Национальной академии микологии,
Заслуженный врач России,
доктор медицинских наук, профессор

Ю.В. Сергеев

Сведения об авторах

Феофилова Елена Петровна – д.б.н., профессор, зав. лабораторией. Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, засл. деятель науки РФ.

Гончаров Николай Гаврилович – д.м.н., профессор, главный врач ЦКБ РАН.

Алехин Александр Иванович – д.м.н., зав. главного врача по научной работе ЦКБ РАН

Мысякина Ирина Сергеевна – д.б.н., ученый секретарь Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

Сергеева Яна Эдуардовна – к.х.н., с.н.с. Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

Fundamentals of Mycology. Designing Drug Preparations from Mycelial Fungi. Feofilova E.P. , Alekhin A.I., Goncharov N.G., Mysyakina I.S., and Sergeeva Ya.E. Moscow, All-Russian National Academy of Mycology

This book deals with drug preparations obtained from fungi. It emphasizes the importance of these natural substances for present-day medicine and discusses the biotechnology of their production. Mycelial fungi are considered not only from the nutritional viewpoint. They are also to be regarded as sources of biologically active substances (immunostimulators, adaptogens, and anticarcinogens) and as agents that can maintain homeostasis and produce antisclerotic, trombolytic, hypotensive, and antibiotic effects. The authors present recent data on the physiological and biochemical properties of fungi that are of paramount importance for developing drug preparations and carrying out innovative biotechnological processes. The book contains a short section concerned with the state-of-the-art of biotechnology in Russia and the recent innovations in this field that are linked to cutting-edge theoretical developments in mycology. Emphasis is placed upon stress, secondary metabolism, and spore formation.

The book is intended for microbiologists, mycologists, health workers, specialists in various subfields of biotechnology, and scientists dealing with related areas of research, as well as university and college students.

The book is printed in Russian Federation as part of a programme of All-Russian National Academy of Mycology, the publisher of Mycology Today Series.

ISBN 8-906062-07-9

See [http:// www.mycologytoday.org](http://www.mycologytoday.org)

Содержание

Предисловие	3
Вступление	9
Часть 1. Физиолого-биохимические особенности, характерные для мицелиальных грибов	13
Глава 1. Какие организмы мы называем грибами, их численность, систематика и распространение	14
Глава 2. Некоторые особенности химического состава грибной клетки	23
2.1. Липиды грибов	23
2.2. Биополимеры клетки и клеточной стенки грибов (поли- и аминополисахариды)	29
2.3. Спорополленин и каротиноиды	33
2.4. Гормональные соединения, контролирующие ростовые процессы.....	34
2.5. Запасные соединения грибов (гликоген, полиолы, дисахариды)	39
Глава 3. Цикл развития грибов, вторичный метаболизм и покой	47
Глава 4. Диморфизм у грибов и факторы, оказывающие влияние на морфогенез	53
Глава 5. Современные представления о стрессе и его использование в биотехнологии	60
Часть 2. Прогресс в области экспериментальной микологии как основа для создания инновационных биотехнологий по получению лекарственных препаратов	69
Глава 1. Краткая история биотехнологии в России и значение грибных производств для человеческого социума	70
Глава 2. Инновации в биотехнологии грибных производств, основанные на новых представлениях об онтогенезе грибов и составе их клеточной стенки....	77

8	<i>Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных...</i>	
2.1.	Инновации в подготовке спорового посевного материала	77
2.2.	Феномен апикального роста грибов и его значение для биотехнологии. Перспективы практического использования хитина грибов.....	83
Часть 3. Основные направления в изучении биологически активных веществ грибов в современной медицине.....		
	Глава 1. Питательная ценность съедобных грибов.....	90
1.1.	Питательная ценность наиболее перспективных съедобных грибов	90
1.1.1.	Химический состав и питательная ценность плодовых тел вешенки	93
1.1.2.	Химический состав и питательная ценность японского гриба.....	100
	Глава 2. Лекарственная ценность грибов	105
2.1.	Лекарственные свойства агариковых и других мицелиальных грибов.....	105
2.2.	Полисахариды и связанные с ними белки, обладающие иммуномодулирующим и противоопухолевым эффектами.....	120
2.3.	Пищевые волокна высших базидиальных грибов.....	125
2.4.	Препараты из грибов как регуляторы деятельности сердечно-сосудистой системы и уровня холестерина в крови	127
2.5.	Антидиабетический эффект препаратов из грибов	128
2.6.	Антибактериальная, антивирусная и антипаразитарная активность грибов	129
2.7.	Токсические вещества высших грибов.....	133
2.8.	Ароматические вещества грибов	135
2.9.	Лекарственные препараты с антиканцерогенными и общеукрепляющими свойствами, выпускаемые в Японии и Китае	137
2.10.	Ранозаживляющие препараты из мицелиальных грибов на основе аминополисахаридов (хитина и хитозана).....	138
2.11.	Использование трегалозы в медицине и пищевой промышленности.....	142
	Заключение	147

Вступление

Написанию этой книги предшествовали многолетние исследования по физиологии и биохимии грибов, которые проводились в Институте микробиологии РАН, начиная с 70–80-х годов прошлого столетия в отделе физиологии и биохимии гетеротрофных микроорганизмов, возглавляемом профессором М.Н. Бехтеревой. На базе этого отдела в 1996 г. была создана специализированная лаборатория – «Экспериментальная микология», направленная на изучение физиологии и биохимии мицелиальных грибов (руководитель профессор Е.П.Феофилова)

Для развития лаборатории большое значение имели основополагающие работы академика В.Н. Шапошникова, профессора М.Н. Бехтеревой и их учеников, посвященные изучению липогенеза мицелиальных грибов (*Zygomycetes* и *Ascomycetes*) и псевдогрибов (царство *Chromista*). В этих исследованиях еще в 80-е годы прошлого столетия впервые было установлено большое разнообразие липидного состава отдельных видов грибов и найдены продуценты с высокой липогенной активностью. Эти работы помимо теоретического обоснования липогенной активности, открывали перспективы для решения ряда практических проблем, например использование липидов грибов, наряду с липидами растений, как заменителей растительных масел (подсолнечного и др.).

В эти же годы начались детальные исследования гетероталлических грибов семейства *Choanephoraceae*, была собрана коллекция разнополюх штаммов муконовых грибов *Blakeslea trispora*, которые были использованы как продуценты β -каротина при составлении заводского регламента по получению провитамина А. Большое значение в создании биотехнологии получения каротина имели исследования профессора Г.И. Самохвалова и

к.х.н. Л.А. Вакуловой. Разработанный способ получения каротина удалось внедрить на трех биотехнологических заводах в СССР.

Практически одновременно на основе полиненасыщенных жирных кислот грибов были получены препараты для медицины: дермалин, пентарол, липар, гаммалин (И.В. Конова, М.Н. Бехтерева, Н.С.Фунтикова). Таким образом, уже в те годы в основе научных исследований лежал принцип внедрения в практику полученных теоретических результатов, и эти работы можно рассматривать как начало нового направления в медицине, которое в XXI веке назовут фармацевтической микологией, целью которой стало получение медицинских препаратов на основе БАВ мицелиальных грибов.

В 1996 г. после образования лаборатории «Экспериментальная микология» основным ее направлением стало изучение разнообразия липидного состава мицелиальных грибов и псевдогрибов, а также биохимическая адаптация грибов к стрессовым воздействиям. В связи с совместными исследованиями с Центральной клинической больницей (ЦКБ) РАН и Институтом хирургии им. А.В. Вишневского РАМН все большее внимание стало уделяться созданию новых лекарственных препаратов на основе биологически активных веществ грибов.

В связи с этим стали изучаться новые таксоны грибов (*Basidiomycetes*), и наряду с липидами начали исследоваться другие важнейшие биомолекулы грибов – протекторные углеводы цитозоля, причем наиболее значимым было изучение физиологической роли дисахарида трегалозы. Сохранилась и основная тенденция отдела М.Н. Бехтеревой – полученные теоретические результаты использовались для создания новых биотехнологий, т.е. внедрялись в практику народного хозяйства.

Обобщение полученных экспериментальных данных позволило создать новое представление об устойчивости клеток грибов при действии стрессора и нашло применение в биотехнологии, в частности, в медицине. Так исследования биополимеров клеточной стенки (КС) грибов, в основном хитина, легли в основу разработки новой отрасли биотехнологии – получению этого аминополисахарида не из панцирей ракообразных, а на основе клеточных стенок мицелиальных грибов. Биотехноло-

гия внедрена на химическом заводе им. Войкова (АС №1003545, 1982 г.)

Значительным достижением явились созданные два новых лекарственных средства – микоран и миколикопин. Препарат микоран противоожогового и ранозаживляющего назначения, разработанный совместно с Институтом хирургии им. А.В. Вишневского (проф. А.А. Алексеев), разрешен к медицинскому применению согласно приказу Минздрава РФ и к использованию в клиниках России. Активным началом микорана являются аминополисахариды КС мукурового гриба – хитин и хитозан. Клинические испытания, проводившиеся в 2002 – 2003 гг., показали, что препарат микоран может быть использован не только как противоожоговый препарат, но и для лечения гнойных и долго незаживающих ран у больных диабетом.

Второй препарат – миколикопин – создан совместно с Онкоцентром РАМН и ЦКБ РАН и предназначен для лечения рака предстательной железы. Эти работы отмечены золотыми, серебряными медалями и грамотами на российских и международных выставках. В развитие этих исследований большое значение имели данные, полученные А.С.Меморской и В.М.Тершиной.

В лаборатории экспериментальной микологии продолжались работы по биоактивным липидам, в том числе фармацевтически активным жирным кислотам. В этом плане представляют интерес данные, о высокой липолитической активности *Pythium debarianum*, который можно рассматривать не только как источник полиненасыщенных жирных кислот, но и ферментного препарата – липоксигеназы. Установлен стимулирующий эффект ряда жирных кислот на образование γ -линоленовой кислоты мукуровыми грибами.

В исследовательских работах лаборатории есть еще одно направление – биотехнология выращивания шляпочных грибов (Basidiomycetes) и определение их питательной и медицинской ценности. Начинает развиваться и новая отрасль косметики, использующая БАВ грибов для создания кремов и мазей. И в этом отношении, благодаря тесным связям с ЦКБ РАН, все большее внимание уделяется лекарственным препаратам из грибов и их практическому внедрению.

Книга посвящена лекарственным препаратам из грибов, биотехнологическим методам их получения и значению этих природных веществ для современной медицины. Но, учитывая все возрастающий интерес к представителям царства Fungi, мы сочли полезным предварительно изложить современные данные о тех физиолого-биохимических особенностях грибов, которые необходимы для понимания их роли в создании лекарственных препаратов и в инновационных биотехнологических процессах. Мы сочли также полезным ввести краткий раздел о состоянии биотехнологии в России и об инновациях в этой отрасли науки, связанных с последними теоретическими достижениями в микологии, в частности, с ролью стресса, вторичного метаболизма и спорогенеза.

Часть I
Физиолого-биохимические
особенности, характерные
для мицелиальных грибов

Глава 1

Какие организмы мы называем грибами, их численность, систематика и распространение

Несмотря на то, что наука о грибах – микология – существует уже более двух столетий, до сих пор нет четкого определения организмов, которые мы называем грибами. В известных учебниках по микологии обычно приводится ряд признаков, по которым грибы отличаются от представителей других царств – растений, животных и бактерий, но значимые признаки, общие для всех представителей царства Fungi, практически отсутствуют. Учитывая чрезвычайную гетерогенность грибов, определение этой группы организмов по физиолого-биохимическим признакам становится весьма расплывчатым.

Согласно современным представлениям, грибы отличаются от растений и животных способом питания. Они не автотрофы, как растения, но являются гетеротрофами, напоминая в этом отношении животных, и отличаются от последних тем, что являются осмотрофами, т.е. засасывают питательные вещества, поступающие из окружающей среды. Грибную клетку часто сравнивают с кишечником млекопитающих, который у грибов как бы вывернут наружу, и переваривание большинства питательных веществ протекает во внешней среде, а затем идет их поступление внутрь клетки.

Мицелиальным грибам свойствен поляризованный верхушечный рост, который помогает им быстро осваивать и использовать ресурсы окружающей среды. Но и в этом отношении грибы не оригинальны, так как поляризованный рост свойствен, например, корневым волоскам растений, пыльцевым трубкам,

некоторым нитчатым водорослям. Кроме того, к царству Fungi относят и дрожжи, имеющие сферическую форму клеток, которая образуется вследствие отложения нового материала не в районе апекса, а по всей поверхности клетки.

Грибам свойственна также клеточная стенка, которая, однако, есть и у растений. Однако представители царств Fungi и Plantae значительно отличаются по составу биополимеров клеточной стенки, и основным отличием является наличие у грибов аминокполисахарида хитина. Но – последний широко распространен также среди Invertebrata, и его содержание в кутикуле Arthropoda может достигать до 85%. Хитин свойствен также зеленым и диатомовым водорослям, а также некоторым Protozoa. Благодаря наличию клеточной стенки создается и поддерживается высокое внутриклеточное давление, а то, что новая клеточная стенка образуется на апексе гифы, и что там же образуются ферменты, активно переваривающие субстрат, позволяет грибам проходить через твердые субстраты по каналам, которые возникают в перевариваемых веществах. Это делает грибы чемпионами по освоению новых субстратов.

Достаточно часто для характеристики представителей царства Fungi используют «метаболические» критерии или маркеры. Последние являются веществами, которые образуются рядом организмов, но синтез этих соединений происходит различными метаболическими путями. Так, образование лизина может происходить с участием либо α -диаминопимелиновой кислоты (путь ДАП), либо α -аминоадипиновой кислоты (путь ААА). Некоторые грибы, которые называют псевдогрибами и относят к царству Chromista, синтезируют лизин по пути ДАП, а все остальные представители царства Fungi – с участием ААА.

Интересно отметить, что ДАП-путь синтеза лизина характерен для растений, зеленых водорослей и бактерий, а ААА-путь, кроме грибов, найден только у эвгленовых. Биохимические и генетические анализы позволили выявить также различия в некоторых свойствах ферментов, участвующих в биосинтезе триптофана. Используя дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы удалось установить 4 различных типа седиментации ферментов, синтезирующих триптофан:

антранилатсинтетазы, фосфорибозилтрансферазы, фосфорибозилантранилизомеразы и индолглицерофосфатсинтетазы. Оказалось, что типы седиментации этих ферментов у грибов строго коррелируют с определенными полимерами, входящими в состав их клеточной стенки. Так, грибы, имеющие хитин-глюкановый комплекс (отделы Chytridiomycota, Ascomycota, Basidiomycota), имеют одинаковый тип седиментации ферментов, который отличается, например, от такового у Zygomycota, в состав клеточной стенки которых входит хитин-хитозановый комплекс.

Грибы представляют обширную группу организмов. Ранее полагали, что численность видов грибов не превышает 65 тыс., 100 тыс. или 250 тыс. видов. Однако в 1992 г. появилась цифра – 1,5 миллиона, которая на наш взгляд больше соответствует действительности, учитывая, что с каждым годом выделяется все больше новых видов и совершенствуется техника выделения грибов.

Грибы широко распространены по поверхности земного шара и встречаются в пустынях, полярных областях, в глубинах океана, в зонах засоления, в речных водоемах и т.д. В последние годы наши знания значительно пополнились данными о числе видов грибов водных экосистем, щелочных, засоленных почв и термофильных грибах.

Благодаря наличию мощных адаптационных механизмов, грибы оказались хорошо приспособленными к выживанию в экстремальных условиях. В отличие от высших эукариот грибы не приспособливаются к переживанию во время действия неблагоприятных факторов, а переходят в особое состояние, которое называется покоем (dogmancy). Это состояние отличается от анабиоза, так как сохраняется определенная метаболическая активность, но последняя является более низкой, чем при протекании стадии биоза (активной жизнедеятельности).

Для стадии покоя характерно образование специализированных покоящихся клеток. Покой у грибов в значительной степени приходится на морфогенетическую стадию спор, обеспечивающих процесс размножения. Споры отличаются особой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов и низкой активностью метаболизма. Таким образом, грибы как бы уходят от активной жизни при действии стресса и могут длительное

время переживать неблагоприятный период в виде покоящихся (их часто называют спящими) клеток – спор. Это свойство грибов – удивительная способность переживать отрицательные воздействия – имеет большое значение в биотехнологических процессах и сейчас приобретает особую значимость в пищевой индустрии.

Грибы достаточно долго относили к растениям, и только в 1831 г. ряд исследователей (Э. Фриз и др.) выделили грибы в самостоятельное царство – Fungi, или Mycota. В 1998 г. была предложена система (Т. Cavalier-Smith), состоящая из шести царств (Animalia, Protozoa, Bacteria, Fungi, Plantae, Chromista), в число которых было введено третье ботаническое царство – Chromista, состоящее из оомицетов, гифохитридиомицетов, траустохитридиев и водорослей, у которых хлоропласты локализованы внутри полости грубого эндоплазматического ретикулума, но не в цитозоле, как у представителей царства Plantae. Еще одно отличие этой системы состояло в том, что Microsporidia были отнесены к грибам. В данной книге основное внимание будет уделено истинным грибам. Согласно современным системам, основанным на комплексе морфологических, ультраструктурных и молекулярных признаков, грибы разделяют на пять отделов: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota.

Отнесение грибов к растениям и животным, или выделение их в отдельное царство было затруднено также отсутствием достоверных данных о времени появления грибов. Именно данные палеомикологии могли бы во многом прояснить место грибов в системе органического мира как самостоятельного царства. Полагают, что наиболее достоверные данные получены с фоссильными спорами грибов, так как они содержат два вещества – хитин и спорополленин, отличающиеся особой устойчивостью к внешним воздействиям, поэтому споры грибов сохраняются значительно лучше других ископаемых объектов.

В процессе обработки горных пород, где часто встречаются грибные споры, в последние годы достаточно широко используют метод спорово-пыльцевого анализа, метод мацерации и аншлифов. Результаты, полученные с фоссильными спорами

и отпечатками ризоморф, свидетельствуют о том, что разнообразная грибная флора существовала более 200 миллионов лет назад. Более поздние данные, относимые к периоду верхнего докембрия, позволяют считать, что уже в рифее начался переход грибов от водного образа жизни к сухопутному.

В строматолитах докембрия (возраст около 1,3 млрд лет) обнаружены грибоподобные организмы, напоминающие дрожжи и мукоровые грибы. Следует добавить, что ископаемые споры грибов обнаружены в период между нижним неогеном и верхним палеогеном. Если это сопоставить с растительной флорой, то последняя была представлена в основном хвойными и папоротникообразными, так что появление грибов должно быть датировано достаточно поздним периодом.

Однако, несмотря на относительную «древность» грибов, данных палеомикологии явно недостаточно для того, чтобы четко представить эволюцию царства грибов и его связи с растениями и животными. Кроме того, палеонтологические сведения о древних грибах являются достаточно скудными, так как талломы большинства грибов плохо сохраняются в отпечатках, и внимание большинства палеоботаников обращено на хорошо сохранившиеся остатки сосудистых растений.

В последние годы появилась надежда, что данные молекулярной генетики (анализ 18S РНК с использованием базы данных банка генов, число мутационных замен в ряде генов) могут помочь в установлении палеонтологической летописи. Было установлено, что Ascomycota и Basidimycota дивергировали 400 млн лет назад после того, как растения стали сухопутными. Эти данные сопоставили с последними палеонтологическими данными, согласно которым Ascomycota является более древней, чем Basidimycota. Последние «моложе» на 60 млн лет. Что касается Oomycota, то их появление можно отнести к более ранним периодам, вероятно, они появились почти 600 млн. лет назад.

Для расчета скорости эволюции грибов полезным оказалось обнаружение сумчатого гриба *Paleorugenomycites*, возникновение которого датируется около 400 млн. лет назад. Если отнести этот гриб к *Pezizomycotina*, то в этом случае можно предположить, что дивергенция хитиридио- и зигомицетов произошла

630 млн лет назад, а разделение аско- и базидиомицетов произошло 500 млн лет назад, одновременно с появлением сосудистых растений. Дополнительные данные о современном состоянии систематики грибов можно найти в книгах С.Н. Лекомцевой и Л.В. Гарибовой (2005) и Ю.Т. Дьякова и И.И. Сидоровой (2012).

Анализируя существующие системы грибов, можно заметить, что они создавались с учетом данных, полученных с использованием наиболее современных методов исследования. Например, в основе систем грибов могут лежать данные, полученные с использованием электронной и сканирующей микроскопии. В более поздних системах в основу положены результаты, полученные при изучении морфологии определенных стадий онтогенеза грибов, а в последних системах преобладают результаты молекулярной биологии и геносистематики.

Следует также обратить внимание на тот факт, что число систем растет в последние годы с особой быстротой, и, как справедливо отмечают, в основе этих новых систем лежит не систематика, а системотворчество. При этом наблюдается тенденция «растаскивания» организмов, которые ранее относили к царству *Fungi*, в другие царства. Отмечается также определенная направленность в сторону увеличения систематических подразделений внутри царств. Например, царство красных водорослей включает, согласно некоторым системам, подимперию, подцарство, отдел, класс, надтип. Возможно, поэтому, по мнению ряда исследователей, филогенетическая система не упростила некоторые сложности морфологической, но еще усилила их, причем на основе менее наглядных показателей.

Мы уделили особое внимание систематике грибов не случайно. До недавнего времени систематика грибов мало интересовала биотехнологов и медиков, работающих с этими организмами. Однако, начиная с 80-х годов прошлого столетия в связи с интенсивным развитием биотехнологии, эта область исследования приобрела практическое значение. Например, развивающееся грибоводство могло бы использовать определенные ингибиторы или стимуляторы роста и размножения, связанные с систематическим положением грибов. Интересно, что на практическую значимость места грибов в царстве *Fungi*

указывал еще профессор М.В. Горленко. Следует отметить, что систематика грибов прошла достаточно сложный путь, особенно по сравнению с таковой растений, к царству которых достаточно долго относили и грибы. В процессе создания и совершенствования системы использовались различные критерии: от сравнительно-морфологических до молекулярной или точнее геносистематики, основанной на анализе семантид (белков, РНК и ДНК). Важно отметить, что начиная с 90-х годов прошлого столетия уже не вызывало никаких сомнений выделение грибов в самостоятельное царство, а последующие исследования уточнили дискретность царства грибов, выделив из него так называемые «псевдогрибы».

Биотехнология использует грибы как продуценты биологически активных соединений, применяемых в пищевой индустрии, в промышленности, в борьбе с вредными насекомыми, в создании биостимуляторов роста растений. В конце XX в. начала интенсивно развиваться так называемая «красная» биотехнология, основанная на создании медицинских препаратов на основе биологически активных веществ (БАВ) грибов. И, наконец, в середине XX в. внимание биотехнологов переместилось на разрушительную деятельность грибов – биокоррозию строительных материалов и создание биоцидов, создание консервантов для пищевой промышленности, разработку способов защиты памятников и других культурных ценностей (книг, фотографий, картин, тканевых материалов и др.).

В последние годы разрушительная деятельность грибов активно проявляется и в отношении здоровья человеческого социума – речь идет о распространении микозов. Появились данные, что все большее число видов грибов вызывают эти заболевания. В настоящее время дерматофития поражает 5–20% взрослого населения, а список потенциальных возбудителей микозов включает уже более 400 видов грибов.

Цель же нашей книги – «красная» биотехнология, которая в более широком смысле включает БАВ грибов, которые используются как лекарственные препараты и заменители веществ, получаемых из растений и животных в пищевой индустрии.

Литература

- Ботаника. Курс альгологии и микологии. Под редакцией проф. Ю.Т. Дьякова. М.: Изд-во МГУ, 2007. 559 с.
- Гарибова Л.В. Обзор и анализ современных систем грибов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. 28 с.
- Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Учебное пособие. М.: Товарищество учебных изданий КМК, 2005. 220 с.
- Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. М.: Делипринт, 2003. 800 с.
- Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию. М.: Изд-во МГУ, 2000. 190 с.
- Дьяков Ю.Т., Сидорова И.И. Возможная роль грибов в ранней колонизации суши // Ранняя колонизация суши. Программа Президиума РАН «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем». М.: ПИН РАН, 2012. С. 120–137.
- Каратыгин И.В. Козэволюция грибов и растений. 1993. СПб.: Гидрометиздат. Труды БИН. Вып. 9. С. 99.
- Курс низших растений. Под редакцией М.В. Горленко. М.: Высшая школа, 1981. 504 с.
- Курсанов Л.И. Микология. М.: Изд-во АН СССР, 1940. 480 с.
- Нюкша Ю.П. Биологические повреждения бумаги и книг. СПб.: БАН, 1994. 232 с.
- Огарков В.Н., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Грибы – защитники, целители и разрушители. Иркутск: ГУ НЦ РВХ ВНСЦ СО РАМН, 2008. – 248 с.
- Пехташева Е.Л. Биоповреждения и защита непродовольственных товаров. М.: Мастерство, 2002. 224 с.
- Попов П.А. Микроскопические грибы как объект палеонтологических исследований // Микология и фитопатология. 1967. Т. 1. № 2. С. 158–163.
- Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином, 2003. 440 с.
- Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. Влияние консерванта сорбиновой кислоты на состав липидов гриба аскомицетного аффинитета *Penicillium roqueforti* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 5. С. 695–701.
- Сидорова И.И. Микросистема грибов: методология и изменения последнего десятилетия // Новое в систематике и номенклатуре грибов / Под ред. Ю.Т. Дьякова и Ю.В. Сергеева. М.: Национальная академия

- микологии – медицина для всех, 2003. С. 7–70.
- Тахтаджан А.Л. Четыре царства органического мира // Природа. 1973. № 2. С. 22–32.
- Феофилова Е.П. Вклад московских ученых Российской академии наук в развитие микологии в России: физиолого-биохимические исследования и новые биотехнологии // Микология и фитопатология. 2000. Вып. 2. С. 1–6.
- Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А. Видовой состав мицелиальных грибов, поражающих пищевые продукты // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 128 – 133.
- Hawksworth D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised // Mycol. Res. 2001. V. 105. № 12. P. 1422–1432.
- Hawksworth D.L., Rossman A.Y. Where are all the undescribed fungi? // Phytopathology. 1997. V. 87. № 9. P. 888–891.
- Prillinger H., Lopandic K., Schweigkofler W., Deak R., Aarts H.J.M., Bauer R., Sterflinger K., Kraus G.F., Maraz A. Phylogeny and systematic of the Fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota. In: Breitenbach M., Cramer R., Lehler S.B. (eds). Fungal Allergy and Pathogenicity. Chem. Immunol. Basel, Karger, 2002. V. 81. P. 207–295.
- Smith D., Onions A.H.S. The preservation and maintenance of fungi. UK, Wallingford: AB International, 1994. 132 p.
- Tanabe Y., Watanabe M.M., Sugiyama J. Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics // J. Gen. Appl. Microbiol. 2005. V. 51. P. 267–276.
- Whittaker R.H., Margulis L. Protist classification and the kingdoms of organisms // Biosystems. 1978. V. 10. P. 3–18.

Глава 2

Некоторые особенности химического состава грибной клетки

В этой главе книги приводятся данные о тех соединениях, которые активно используются в современной медицине или в грибных биотехнологиях.

2.1. Липиды грибов

Относительно недавно биохимия липидов была запутанной и мало изученной областью и, как писал академик Е.М. Крепс, заслужила у немцев презрительное название *Schmierchemie* (от глагола *schmieren* – мазать). Но уже в начале XX века отношение к липидам резко изменилось благодаря их важнейшему функциональному значению в живой клетке. Этим исследованиям в значительной степени способствовало изучение структуры простых и сложных липидов и развитие приборной техники.

Основной набор фосфолипидов возник, вероятно, очень рано в эволюции растительного и животного мира. Такое постоянство липидного состава, а именно тот факт, что все эу- и прокариоты содержат в качестве основных фосфолипидов (ФЛ): фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин (ФХ), а кроме того, кардиолипин (КЛ) и ряд минорных ФЛ, подтверждает высказывание Е.М. Крепса о том, что, если «природа нашла какой-то удачный способ решения биологической задачи, то она сохраняет его в дальнейшей эволюции». Однако на определенных этапах развития могут появиться новые липидные молекулы, например, сфингомиелин (СМ). Этот фосфолипид отсутствует у большинства беспозвоночных, у которых есть его близкий аналог – церамидфосфорилэтаноламин. Предполагают,

что сфингомиелин свойствен организмам, находящимся на более высоких ступенях эволюции. Этот интересный фосфолипид в значительном количестве присутствует в белом веществе мозга человека и, как и ФХ, является цвиттерионом, обладает высокой устойчивостью к окислению, что очень важно для сохранения стабильности мембран. Так, например, у СМ обнаружена способность проявлять антиоксидантное действие, что приводит к автоматической остановке процессов свободнорадикального окисления липидов. Выше указывалось, что СМ есть у некоторых грибов, причем наиболее вероятно его присутствие у представителей Mucorales.

Фосфолипиды, являющиеся амфипатическими молекулами, составляют основу клеточных мембран, а также являются предшественниками для синтеза макромолекул, молекулярными шаперонами, принимают участие в модификации белков, служат резервуаром вторичных мессенджеров, обеспечивают упорядоченность строения мембран в условиях теплового шока, модулируют устойчивость к токсичным соединениям.

Наряду с данными о тривиальных функциях липидов, есть сведения, что липиды являются важным компонентом не только клеточных мембран, но и хромосом, ДНК-мембранного комплекса и ядерного материала и участвуют в регуляции функционирования ДНК, как при непосредственном взаимодействии с ее структурой, так и за счет изменения активности ферментов метаболизма нуклеиновых кислот.

Резервные липиды грибов и дрожжей представленные, главным образом, триацилглицеринами (ТАГ) и эфирами стерина (ЭСт), являются неотъемлемой частью общего метаболизма ацилглицерина, служат оперативным резервом жирных кислот в биосинтезе фосфолипидов и локализованы преимущественно в липидных гранулах. Кроме того, есть сведения, что они в небольших количествах находятся в других клеточных компартментах (микросомах, митохондриях, ядрах), синтезируются *in situ* и имеют специфический состав жирных кислот, что свидетельствует о существовании пространственно-разграниченных пулов ТАГ и выполнении ими функций, не ограничивающихся только резервной.

Предполагают, что по своему строению мембрана грибов сходна с таковой животных. Основные компоненты фосфолипидного бислоя – ФХ и ФЭ – однотипны для грибов, животных, растений и прокариот. Согласно последним данным, содержание ФХ у почкующейся бактерии *Hyphomicrobium vulgare* NP-160 достигает 35% от суммы общих липидов, т.е. даже больше, чем у животных. Следует, однако, отметить, что прокариоты, в отличие от высших организмов, синтезируют ФХ только путем N-метилирования эндогенного ФЭ с вовлечением S-аденозилметионина как донора метильных групп.

Мембраны животных и грибов отличаются от мембран фотосинтезирующих организмов тем, что у первых основную часть полярных липидов составляют глицерофосфолипиды и сфинголипиды, а у фотосинтетиков главными являются глицерогликолипиды. В то же время у зеленых водорослей-макрофитов и у Basidiomycota есть диацилглицерилтриметилгомосерин – липид, специфичный только для этих групп организмов.

Известно, что длинноцепочечные жирные оксикислоты (ДЖОК) (оксиполинены насыщенные) широко распространены у животных и растений. В последние годы получены данные, подтверждающие наличие ДЖОК у грибов. Однако пути синтеза этих кислот различаются у отдельных видов грибов. У большинства из них ДЖОК являются результатом действия моноаминоксигеназ, в то время как у Oomycota и аскомицетов рода *Dipodascopsis* (дрожжи) в образовании ДЖОК участвуют циклооксигеназы. Грибы образуют C_{20:4} и C_{20:5} жирные кислоты, как растения и водоросли, особенно активными продуцентами являются псевдогрибы Oomycota. В этом случае нет различий между систематическими группами.

Недавно было показано, что и дрожжи (*Rhodotorula bacarum*, *R. aurantiaca* и *R. acheniorum*) синтезируют арахидоновую кислоту. Однако отличия в составе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) проявляются в их специфичности: например, бурые водоросли синтезируют до 12% такой редкой жирной кислоты, как стеаридоновая, которой нет у грибов и растений.

С растениями грибы сближает наличие эссенциальных жирных кислот – линолевой и линоленовой. Последнюю кислоту

образуют только мицелиальные грибы, но не дрожжи, у которых преобладающие ненасыщенные жирные кислоты представлены пальмитолеиновой ($C_{16:1}$) и олеиновой ($C_{18:1}$). Недавно, однако, показано, что дрожжи рода *Rhodotorula* образуют линоленовую кислоту. Представляют интерес данные о том, что низшие грибы образуют γ -линоленовую кислоту, а высшие – α -линоленовую. Однако в последние годы установлено, что грибы рода *Aspergillus* в начальной стадии трофофазы содержат в липидах мицелия оба изомера $C_{18:3}$, в стадии же идиофазы идентифицируется только α - $C_{18:3}$. Особенно много линолевой кислоты в липидах Basidiomycota – содержание $C_{18:2}$ может достигать более 70% от суммы жирных кислот. Этим базидиомицеты отличаются от аскомицетов и муковых грибов.

Интересную информацию о гетерогенности грибов может дать дальнейшее сопоставление их липидного состава с высшими эукариотами и прокариотами. Принято считать, что основной нейтральный липид мембран – холестерин – специфичен для животных, ситостерин – для растений, а эргостерин – для грибов. Однако получены данные о том, что холестерин является доминирующим стеринном красных водорослей, ряда растений и микромицета *Trichoderma reesei*. У мицелиальных грибов на примере *Gibberella fujikuroi* показано, что основными стеринами, в отличие от дрожжей, являются 24- β -метил-стериновые соединения, которые образуют, наряду с эргостерином, брассикастерин, 24-метилхолестерин, тогда как у дрожжей синтезируется единственный 24-метилстериновый конечный продукт – эргостерин.

Интересно, что состав стеринов предполагают использовать для таксономии агариковых грибов на родовом уровне. Наиболее значимым в качестве хемотаксономического критерия считается 5-дигидро- и 22-дигидроэргостерины, а также холестерин.

Особый состав стеринов имеют оомицеты, у которых эргостерин не является основным стеринном. В группу стеринов оомицетов входят: холестерин, десмостерин, 24-метилхолестерин и иногда фукостерин. Последний преобладает у видов *Achlya*. Интересно, что под действием тридеморфа – ингибитора синтеза Δ^2 - Δ^7 -изомераз – у оомицетов синтезируется ланостерин, а не циклопропилстерины, например, циклоартенол, который

свойствен растениям. Таким образом, по составу липидов грибы обнаруживают сходство как с животными, так и с растениями и даже с прокариотами. Однако наличие сфингомиелина и специфических стериннов позволяет говорить о том, что по составу липидов некоторые грибы более близки к животным, чем к остальным царствам органического мира.

Основными функциями липидов считается т.н. массивная "bulk"-функция, подразделяющаяся на структурно-функциональную и запасную, и специфическая регуляторная функция.

Известно, что первичной функцией липидных мембран является создание полупроницаемого барьера клетки. Кроме того, они являются матриксом для белков, участвующих в таких важных функциях как генерирование энергии, передача сигнала, обеспечение транспорта веществ, репликации ДНК, секреции, регуляции активности мембранно-связанных ферментов и др. Липидный бислой плазматических мембран образован фосфолипидами (ФЛ), гликолипидами (ГЛ) и стеринами.

На процесс формообразования живой клетки значительное влияние оказывает фазовое состояние мембранных липидов, которые обеспечивают поддержание жидкостности (матричная функция), стабильности (механическая функция) и проницаемости (барьерная функция). Известны несколько фазовых переходов, из которых наиболее изучен переход из жидкокристаллического состояния в гелевое, при котором сохраняется бислое состояние мембраны, но меняется ее жидкостность. Мембрана может находиться в гексагональном состоянии и кубическом, причем при этих фазовых переходах жидкостность мембраны сохраняется, но теряется ее бислое состояние. В зависимости от физиологического состояния клетка может регулировать состояние мембраны путем соответствующего подбора липидного состава. Так, например, при высокой температуре или низком содержании воды образуются гексагональная и кубическая фазы. В последние годы в изучении фазовых переходов мембран, помимо фосфолипидов, значительное внимание уделяется стеринам, в частности, холестерину и эргостерину, входящим наряду со сфинголипидами в доменные структуры, получившие название липидных рафтов. Рафты можно видеть

под микроскопом, используя полиеновый антибиотик филиппин, который специфически окрашивает 3- β -оксистерины. Это позволило установить, что рафты располагаются в растущей части на кончике гифы. Ингибирование образования сфинголипидов у *Aspergillus nidulans* путем использования мириоцина вызывало остановку роста гифы и образование бокового ветвления, что позволило предположить, что рафты необходимы для поляризованного роста грибов.

Рафты различаются не только по содержанию индивидуальных липидов и их качественному составу, но и по величине (от 10 – 100 до 1000 мкм). Липидные домены, содержащие преимущественно стерины (SRDs-рафты), более крупные по размерам, активно участвуют в морфогенезе грибов и специфически располагаются на кончике гифы. SRDs-рафты не обнаруживаются у почкующихся дрожжей *Candida albicans*, но присутствуют в мицелиальной форме этих грибов. Таким образом, наличие стеринсодержащих липидных доменов в мембранах можно рассматривать как один из механизмов, оказывающих влияние на жизнедеятельность клетки и ее метаболизм.

Следует особо остановиться на сигнальной функции липидных молекул. Трансмембранная передача сигнала может осуществляться через ионные каналы, рецепторные киназы или через рецептор-активируемый эффекторный фермент, который образует внутриклеточные вторичные мессенджеры. Так как эффекторные ферменты локализованы на поверхности клетки, мессенджеры часто образуются из мембранных компонентов, основную массу которых составляют фосфолипиды.

Мессенджер передает сигнал киназам в различные каскады, затем активируются факторы транскрипции и синтез белков, формируя, таким образом, физиологический ответ, который может быть задействован в процессе морфогенетической дифференцировки или других клеточных процессах. Кроме того, некоторые физические или химические сигналы могут взаимодействовать непосредственно с липидной составляющей клеточной мембраны, вызывая ее модификацию, что приводит к изменению конформации рецепторного белка и включению сигнальной системы. Все вторичные липидные мессенджеры

образуются из основных мембранных предшественников – ФХ и СМ. ФХ гидролизуеться в результате рецептор-опосредованной стимуляции специфической фосфолипазы С с образованием диацилглицерина (ДАГ) или через стимуляцию фосфолипазы D с образованием фосфатидной кислоты (ФК). Далее ФК может превращаться в лизо-ФК под действием фосфолипазы А-типа или в ДАГ под действием фосфатидат-фосфогидролазы. ДАГ также может образовываться фосфоинозитид-специфической фосфолипазой С, действующей на фосфатидилинозит-4,5-дифосфат.

Образованные в результате действия фосфолипаз ФК, лизо-ФК и диацилглицерина имеют отношение к контролированию многих клеточных функций. ДАГ является активатором протеинкиназы С, а ФК и лизо-ФК стимулируют различные киназы и активируют Ras-МАРК путь передачи сигнала и оказывают влияние на пролиферативные свойства клеток. СМ, как и ФХ, гидролизуеться фосфолипазой С с образованием фосфорилхолина и церамида, который, в свою очередь, также является вторичным мессенджером, участвующим путем ингибирования активности фосфолипазы D в регуляции цитодифференцировки и других процессах. Таким образом, отмечается противоположное влияние липидов: ДАГ стимулирует активность протеинкиназы С (в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов), а производное СМ – сфингенин – ингибирует.

Заканчивая эту главу, хочется привести высказывание академика Е.М. Крепса на одном из его выступлений в Ленинграде: «Мы пока мало знаем о функциональном значении липидов, но уже сейчас удивляемся, как важны и многофункциональны эти соединения».

2.2. Биополимеры клетки и клеточной стенки грибов (поли- и аминополисахариды)

Клеточная стенка (КС) имеет чрезвычайно важное значение для всей клетки: ею определяется размер клетки и ее форма на всех этапах жизненного цикла. Это не мертвая, неактивная структура, которую сравнивали со стенами дома, несущими только опорную нагрузку, а живая, динамическая система,

активно взаимодействующая с нижележащей протоплазмой и окружающей средой и контролирующая рост грибной гифы.

Сведения о структуре, составе и биосинтезе КС можно найти в обзорных работах, цитируемых в списке литературы. Во всех исследованиях можно проследить ключевую роль метаболизма хитина в росте гифы и тот факт, что микрофибриллы хитина являются первичным «скелетом», на котором строится клеточная стенка.

Рост грибной клетки может быть либо сферическим, либо апикальным (поляризованным). Первый свойствен дрожжевым организмам, второй – мицелиальным грибам. Синтез КС у последних происходит в два этапа. Так называемая первичная КС синтезируется путем отложения новых слоев биополимеров на кончике гифы, вторичная КС образуется в дистальной части гифы, обычно отложением нового материала на наружной части первичной КС. Свойства этих двух типов КС различны. Так, первичная КС более хрупкая и легко лизируется в гипотоническом растворе. При превращении во вторичную КС, эта структура меняет свои свойства, становясь более прочной и более толстой.

Процесс увеличения прочности КС грибов включает следующие этапы:

- 1) поперечное связывание компонентов;
- 2) связывание индивидуальных полисахаридов в микрофибриллы;
- 3) отложение новых компонентов КС.

Согласно современным представлениям, образование гифальной или дрожжеподобной клетки у грибов можно представить, на основе стационарной («steady-state») и гифоидной моделей, включающую «центр управления движением везикул».

Согласно первой модели, хитин и глюкан синтезируются в апексе гифы и они ковалентно не связаны, что делает клеточную стенку гибкой и легко меняющей свою форму. Удлинение гифы может происходить только в случае, если происходит образование поперечных связей хитина с глюканом и кристаллизация хитина.

Вторая модель основана на предположении, что в апексе гифы имеется специальный центр, который управляет скоростью дви-

жения везикул, переносящих субстраты для синтеза клеточной стенки. Это специальные макровезикулы, которые в световой микроскоп выглядят как темные тельца, и которые получили название спитценкорпер (Spitzenkörper). Если скорость движения микровезикул достаточно велика, то происходит удлинение гифы и образование мицелия. В этом процессе значительная роль в росте гифы принадлежит также F-актину и миозину-V.

Несомненный интерес представляют данные, основанные на филогенетическом сравнении рРНК и консервативных белков, позволяющие заключить, что апикальный рост грибов сходен с ростом пыльцевых трубочек и корневых волосков, и сам механизм удлинения гиф напоминает движение амеб.

У мицелиальных грибов поперечно связанными компонентами микрофибрилл КС является хитин и триплетный хеликс β -1,3-глюкановой цепи. Эти два биополимера придают прочность КС грибов, причем особую устойчивость придают хитиновые цепи. С практических позиций наибольший интерес представляют именно эти два биополимера – хитин и β -1,3-глюкан. И хотя до сих пор основным источником хитина являются крабы (см. Часть 3, разд. 2.10), хитин грибов отличается по ряду свойств от хитина членистоногих, что определяет предпочтительное использование аминополисахарида грибов в медицине.

Хитин выполняет в грибной клетке ряд очень важных функций, в частности, участвует в антистрессовой защите. Процесс сохранения клетки при неблагоприятных воздействиях зависит от состава КС, в частности, от уровня в ней хитина. При переходе грибов в стадию идиофазы при голодании происходит образование покоящихся клеток, при этом резко увеличивается содержание хитина, например, у *Aspergillus niger* содержание этого полимера увеличивается в среднем в 2,5 раза. Интенсификация синтеза хитина, который недаром называют «щитом» клетки, происходит только при определенных условиях, а именно на фоне изменения в составе мембранных и нейтральных липидов, а также микровязкости липидного бислоя. Происходит обогащение мембраны фосфатидилинозитом (почти в 3 раза), а в составе нейтральных липидов увеличивается уровень эфиров стерина. Эти данные позволяют предположить, что увеличение количества хитина контролируется определенными изменениями

в составе липидного бислоя (гиперсинтезом ряда фосфолипидов и стериновым «механизмом»).

Соотношение структурных компонентов КС – хитина и глюкана – изменяется не только в процессе онтогенеза мицелиальных грибов, но и зависит от состава среды культивирования. Для *Aspergillus niger* показано, что наибольшее количество хитин-глюканового комплекса (ХГК) образуется на средах с сахарозой и аммонийным азотом при сильном закислении до рН 2.0. Наибольшее количество глюкана по сравнению с хитином образовывалось на средах с высоким содержанием азота. С животными грибами сближает и тот факт, что ультраструктурная локализация хитина в клеточной стенке грибных спор практически такая же, как и в кутикуле насекомых. Тем не менее пути образования хитина, вероятно, различаются у мицелиальных грибов и Arthropoda.

У некоторых грибов на поверхности КС обнаружен слизистый материал, состоящий из полисахаридов, представленных β -глюканами, содержащими только глюкозные единицы, и соединенными β -1,6-связями с каждой третьей единицей глюкозы по длине основной цепи. На внешней поверхности КС гифы присутствует S-глюкан, состоящий исключительно из 1,3-связанных глюкозных остатков, и особые гидрофобные белки, называемые гидрофобинами, а также пигменты фенольной природы – меланины. Вопрос о том, присутствуют ли в КС грибов белки, всегда вызывал дискуссии в связи с таким критерием, как чистота выделенных КС. Большинство белков КС являются гликозилированными; кроме того, присутствуют белки, участвующие в транспорте железа, и специальные белки, способствующие выживанию в стрессовых условиях. В КС грибов обнаружены также полисахариды, которые расположены на внешней поверхности и защищают гликопротеины более глубоких слоев КС.

Установлено, что состав белков КС, ковалентно связанных с полисахаридами, зависит от окружающих условий и стадии развития. На поверхности грибных клеток располагаются также особые белки, которые получили название амилоидные белки. Один из таких белков – глюкантрансфераза – выделен с поверхности дрожжей. Содержащийся в КС некоторых грибов

пигмент черного цвета фенольной природы – меланин – выполняет защитные функции благодаря тому, что в его молекуле присутствуют неспаренные электроны. Кроме того, меланин обладает выраженной антиоксидантной активностью.

В клеточной стенке грибов содержатся уроновые кислоты. Они входят в состав клеточных гетерополисахаридов. Для муконовых грибов характерен мукоран и D-глюкуроновая кислота (муконовая). В состав мукорана входят: D-глюкуроновая кислота, L-манноза, D-фукоза. Мукоран в клеточной стенке *Mucorales* связан со спорополленином.

Для создания медицинских препаратов наибольший интерес представляют содержащиеся в КС грибов глюканы и аминополисахариды. В последнее время уроновые кислоты и мукоран считаются перспективными с точки зрения их использования в качестве противоотечных соединений. Более подробные сведения о веществах, содержащихся в КС грибов и обладающих лекарственными свойствами, можно найти в Части 3, разд 2.2.

2.3. Спорополленин и каротиноиды

Спорополленин, благодаря своим необычным физико-химическим свойствам, представляет интерес в биотехнологии и используется в приборостроении (для покрытия особо охраняемых поверхностей) и в медицине (для длительного хранения в критических условиях особо ценных препаратов).

Спорополленин – чрезвычайно устойчивое соединение, которое не гидролизуется щелочами, кислотами (серной, соляной, фосфорной и др.). Дегградация спорополленина происходит только при действии сильных окислителей (озон, перекись водорода, азотная кислота, хромовая кислота). Элементарная формула спорополленина: $C_{90}H_{128-144}O_{16-33}$. Предполагают, что спорополленин имеет своим предшественником каротиноиды и эфиры каротиноидов и образуется в результате окислительной полимеризации молекул каротиноидов.

Этот биополимер найден в спорах и зиготах *Mucor mucedo*, *Rhizopus sexualis*, *Phycomices blakesleeanus*, *Neurospora crassa*, *Ascobolus crenulatus*, где спорополленин обеспечивает защиту покоящихся клеток от отрицательных внешних воздействий.

Интересно, что спорополленин обнаружен и у водорослей Chlorophyceae (*Chlorella*, *Colleastrum*, *Scenedesmus*, *Prototheca*, *Pediastrum*), а также в ооспорах харовых водорослей (*Chara corallina*). Основными же организмами, содержащими спорополленин, являются растения, где он присутствует в экзине пыльцевых зерен, а также в спорах папоротников и мхов.

Выше отмечалось большое значение спорополленина в палеомикологии. Ископаемые органические остатки, в которых присутствует спорополленин, позволили сделать ряд важных предположений. Находки спорополленина в карбонатных метеоритах наводят на мысль о том, что споры грибов, возможно, могли выступать в роли «панспермина», что может свидетельствовать в пользу внеземного происхождения жизни. Наличие спорополленина у растений может свидетельствовать о том, что семенные папоротники явились той группой, от которой возникли голосеменные и покрытосеменные растения.

Для удобства изложения необходимые сведения о каротиноидах приводятся дальше в Главе 3.

2.4. Гормональные соединения, контролирующие ростовые процессы

У грибов процесс половой репродукции контролируется специальными соединениями, называемыми гормонами. Впервые определение этого термина было дано в 1935 г. для растений и позже дополнено в отношении грибов. Первоначально гормонами называли соединения, функция которых заключается в регулировании полового процесса. В настоящее время гормоны грибов разделяют в зависимости от специфических свойств на феромоны, ростовые вещества, морфогены и секс-факторы по аналогии с секс-аттрактантами, ауксинами растений, ретиноевой кислотой.

Существуют и другие типы классификации гормонов. Например, гормоны, контролирующие половую репродукцию грибов, называют эрогенами, а эротактины – это гормоны, привлекающие друг к другу подвижные клетки (гаметы), эротропины определяют направление роста неподвижных клеток, участвующую

щих в копуляции. Для веществ, называемых гормонами грибов, характерно то, что они действуют в низких концентрациях, очень нестабильны и легко разрушаются при действии клетки-реципиента. К характеристике этих веществ следует добавить то, что они, как правило, синтезируются в очень небольших количествах (10^{-8} – 10^{-11} М) на определенных стадиях развития организма, что затрудняет определение их химической природы.

Кроме того, гормоны грибов могут выполнять дополнительные функции в клеточном метаболизме, что также препятствует их идентификации. Например, половые гормоны муковоксовых грибов – триспорные кислоты (ТСК) – первоначально были открыты как стимуляторы каротиногенеза. У грибов, как и прочих организмов, наиболее существенным для сохранения вида является процесс половой репродукции, и природа затратила в данном случае достаточно усилий, чтобы этот процесс был воспроизводимым, используя для этих целей гормональную регуляцию. Именно гормоны, благодаря специализированному химическому строению, обладают способностью контролировать репродукцию разнополых организмов.

Здесь уместно особо остановиться на примере гормонов грибов, которые в большинстве случаев являются липидоподобными соединениями, точнее – терпеноидами. Эти молекулы относят в настоящее время к категории эволюционно наиболее древних соединений, обнаруживающих «эффект малых молекул» (теория динамической игры малых молекул в процессе эволюции).

Вероятно, не случайно гормоны грибов и псевдогрибов, участвующие в половом процессе, также являются терпенами и стеринами. Так, женский половой гормон водной плесени *Achlia ambisexualis* – антеридиол (ранее его называли гормоном А) – является стероидом ($C_{29}H_{42}O_5$), вызывающим ветвление гиф. Мужские клетки, в свою очередь, образуют гормон В (оогониол), который является эфиром стерина ($C_{33}H_{54}O_6$), под влиянием которого женская клетка образует оогонии. Гормон В представляет собой 7-кето- C_{29} -стерин, не имеющий лактонового кольца, свойственного антеридиолу. Предшественником обоих гормонов является стерин фукостерин.

У большинства грибов процесс репродукции обладает интересной особенностью. В 1904 г. Блакесли, исследуя половое размножение муковых грибов, в частности *Blakeslea trispora*, установил, что если выращивать эти грибы из одной споры, то образование зигот не происходит. Основным условием протекания полового процесса является копуляция мицелиев, отличающихся в половом отношении. Такие мицелии Блакесли обозначил как (+) и (-), а сам феномен раздельнополости у грибов получил название гетероталлизма.

Несколько позже раздельнополость была обнаружена и у других Mucogales, например, у грибов рода *Absidia*. У этих грибов были установлены различия в величине и строении копулирующих органов, и в данном случае такие обозначения мицелиев, как (+) и (-) могут быть заменены названием женский и мужской мицелии, а термин гетероталлизм приобретает у грибов более точное значение как раздельнополость, соответственно, гомоталлизм рассматривают как обоеполость. Гетероталлизм, впервые обнаруженный у Mucorales, в настоящее время установлен практически у всех групп грибов, но преобладает и лучше изучен именно у муковых. У последних около 60 видов являются разнополыми и только 20 – однополыми (гомоталлическими). Гетероталлизм распространён также и среди Basidiomycetes. У головневых этот феномен установлен для 50 видов.

Как указывалось выше, гормональная регуляция полового процесса лучше всего изучена у муковых грибов, а именно у *Blakeslea trispora*. К 2011 г. этот процесс был практически полностью исследован Серда-Олмедо (Cerde-Olmedo) с сотрудниками, который сообщил о новых апокаротиноидах и месте разрыва молекулы каротина при протекании процесса половой репродукции у этого гриба. Было обнаружено 12 апокаротиноидов: два C-18 триспороида, три C-15 соединения с моноциклофарнезановым скелетом, C-13 соединение и пять соединений с 2-метилгексановым скелетом. Шесть из этих метаболитов являются новыми природными продуктами и два – новыми для *B. trispora*, причем структура C-7 и C-13 соединений подтверждена химическим синтезом. Эти данные позволили высказать предположение, что каротин расщепляется на три фрагмента: у 13, 14 и 11, 14 двойных связей.

Стерины также участвуют в репродукции псевдогрибов. Последние (например, *Phytophthora* и *Pythium*) не способны синтезировать стерины, хорошо растут в отсутствие этих соединений, но нуждаются в них для репродукции. Так, эргостерин стимулирует образование спорангиев у *Phytophthora* sp. Стерины необходимы и для половой репродукции (образование ооспор) у *P. coactorum*. В этих процессах наиболее активны C_{29} -стерины с α -конфигурацией при C_{24} боковой цепи – ситостерины и стигмастерины. C_{27} -стерины имеют более низкую активность, C_{28} -стерины обладают промежуточным эффектом. У гетероталлических штаммов фитотфоры холестерин стимулирует образование ооспор, причем эффект проявляется более заметно, если холестерин добавляется к обоим гетероталлическим штаммам. Таким образом, в процессе репродукции растительных патогенов (*Phytophthora*, *Pythium*) им необходимы стерины, так как эти организмы сами их не образуют. В этом случае можно провести аналогию с патогеном насекомых – *Lagenidium giganteum*.

Половая репродукция хитридиевых грибов (виды *Allomyces*) сопровождается образованием мужских и женских гаметангиев. При истощении источников питания процесс гаметогенеза происходит с образованием небольших мужских гамет, содержащих γ -каротин и имеющих ярко-оранжевую окраску, и более крупных по размерам женских гамет. При контакте этих клеток происходит образование бифлагеллярной зиготы. Гормоном женской гаметы является сиренин – сесквитерпен $C_{15}H_{24}O_2$. Гормон мужских клеток – паризин – тоже относится к терпенам.

Кроме терпеноидов и другие липидоподобные соединения стимулируют процесс репродукции грибов. Например, арахидоновая и олеиновая кислоты стимулируют образование зигот в присутствии полового феромона у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Образование плодовых тел у *Schizophyllum commune* стимулируется цереброзидами. У микроорганизмов описан также ряд газообразных гормонов, действующих в концентрации 10^{-9} М. Это, например, метиловый эфир 3-оксипальмитиновой кислоты – новый ауторегулятор, контролирующей вирулентность.

Заметное сходство между грибами и растениями наблюдается в способности образовывать одни и те же гормоны, контроли-

рующие ростовые процессы. Так, известный регулятор роста растений – гормон старения или опадания листьев – абсцизовая кислота (АБК) – является метаболитом ряда патогенных грибов. Впервые АБК была найдена у *Cerospora rosicola*, а позже у *Alternaria brassicae* – патогена, образующего черные пятна на растениях. Патогенные грибы, вызывающие болезни листьев Graminaceae – *Cochliobolus specifer*, образуют еще один регулятор роста растений – специферин

Гормональный контроль роста высших растений осуществляют также ауксины и цитокинины. Эти же фитогормоны идентифицированы у дрожжей. У *S. cerevisiae* впервые выделен природный ауксин – β -индолилуксусная кислота. Интересно, что этот гормон дрожжи образуют в количествах, сопоставимых с растениями.

Аскомицеты способны синтезировать и цитокинины (N⁶-[Δ^2 -изопентенил]аденозин). Наиболее достоверно образование этого цитокинина показано у *S. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. Цитокинины, в частности, зеатин и рибозид зеатина, синтезируют и микоризные грибы *Rhizopogon roseolus*. Грибы, например фитопатогенный гриб *Fusicoccum amygdaly* Del., образуют активные фузикокинины, обнаруженные также среди метаболитов высших растений.

Вещества с физиологической активностью гиббереллинов (ГБ) обнаружены не только в клетках растений, у которых они стимулируют рост стебля, прорастание семян и др. процессы, но и у водорослей, бактерий (в том числе и у актиномицетов) и грибов (мицелиальных и дрожжей). Известно более 50 видов грибов, образующих ГБ (представители родов *Fusarium*, *Cercospora*, *Botrytis*, *Alternaria*). Среди них наиболее активными продуцентами являются *Gibberella fujikuroi* и *Sphaceloma manihoticola*, способные образовывать более 400 мг ГБ в 1 л среды. Свободные и связанные ГБ содержат также споры многих грибов, в частности *Aspergillus japonicus*. Интересно, что споры грибов, способные к более быстрому прорастанию, содержат меньше ГБ, но больше эфиров стериннов. В то же время в активно растущем мицелии грибов преобладают ГБ. Грибы содержат также гормоны, сходные с обнаруженными у позвоночных и насекомых (см. Табл. 1).

Таблица 1. Гормоны грибов и их аналоги у позвоночных и насекомых

Стероид 5- α -андрост- 16-ен-3- α -ол	<i>Tuber melanosporum</i>	Феромон борова
Прогестерон	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Млекопитающие
α -Фактор	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Гонадотропин-высвобождающий гормон животных
Сиренин	<i>Allomyces macroginus</i>	Ювабион насекомых
Триспоровые кислоты	<i>Blakeslea trispora</i>	Абсцизин, ретиноевая кислота
Инсулин	<i>Neurospora crassa</i>	Инсулин

Область микологии, исследующая гормоны грибов, вызывает сейчас особый интерес, так как открывает возможности использования этих соединений в сельском хозяйстве, как стимуляторы роста, и в медицине (особенно стероидные гормоны и инсулин).

2.5. Запасные соединения грибов (гликоген, полиолы, дисахариды)

Гликоген служит запасным соединением грибов. Этот растворимый глюкан, содержащий только α -1,4 и α -1,6-связи между гликозильными остатками, достоверно обнаружен в мицелии у Chytridiomycetes в количестве 6%, в частности у *Monoblepharella elongata* и *Rhizophydium sphaerotheca*. У *Coprinus macrorhizus* обнаружены те же взаимопревращаемые формы гликогенсинтетазы (УДФ-глюкоза: гликоген- β -4-гликозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11), что и у животных. Те же формы этого фермента обнаружены у *Neurospora crassa* и *Saccharomyces cerevisiae*. У последнего отмечается наиболее высокое содержание гликогена – до 15–20% сухой массы клетки. Однако у Oomycota (*Pythium debarianum*, *Mindeniella spinospora* и *Apodachlya* sp.) обнаружен только рас-

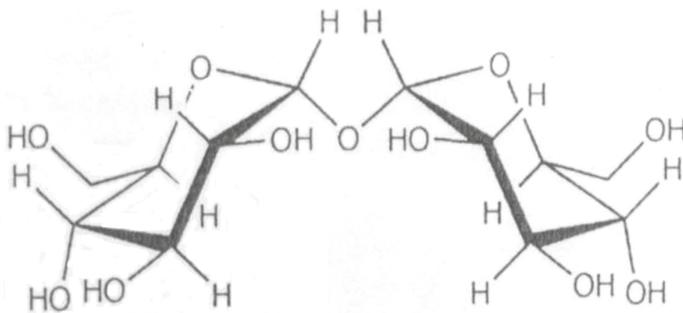
творимый глюкан, содержащий β -1,3- и β -1,6-гликозильные остатки. По своим свойствам он сходен не с гликогеном, а с миколаминарином, т.е. у оомицетов нет гликогена. Интересно, что миколаминарин содержат бурые водоросли. Этого растворимого полисахарида нет, например, у красных водорослей, которые содержат специальный глюкан, называемый багрянковым крахмалом. Следует особо отметить, что гликоген, являющийся запасным веществом у животных, протозоа и грибов, обнаружен и у прокариот, например, у *E. coli* и цианобактерий. Таким образом, общепринятый критерий – наличие гликогена – сближает грибы не только с животными, но и с прокариотами.

У грибов гликоген накапливается в клетках перед началом спорообразования и является триггером этого процесса. В то же время вторым соединением, контролирующим процесс спорообразования, точнее, прорастание спор, является дисахарид трегалоза. Запасными соединениями грибов являются также ациклические полиолы: маннит, эритрит, арабит, инозит, глицерин, хертитол. Биологическая функция полиолов неясна, хотя предполагают, что они, как и трегалоза, могут выполнять протекторные функции. Полиолы образуют также водоросли, высшие растения и лишайники. Однако среди грибов указанные полиолы образуют только аскомицеты и базидиомицеты, в то время как *Zygomycetes* их не образуют. Ряд исследователей придерживается мнения, что оомицеты вообще не способны синтезировать полиолы.

В последние годы среди запасных соединений грибов наибольший интерес вызывает дисахарид трегалоза, который используется в медицине и приобретает все большее значение в биотехнологических разработках. Поэтому мы посчитали необходимым уделить этому необычному сахару особое внимание.

Трегалоза существует в виде трех изомеров: α,α -трегалозы, α,β -трегалозы и β,β -трегалозы. Два последних изомера, называемые, соответственно, неотрегалоза и изотрегалоза, не встречаются в природе. α,α -Трегалоза (грибной сахар, микоза, α -D-гликозил- α -D-гликозилпиранозид) – природный изомер трегалозы, впервые обнаружен еще в 1832 г. в ржавчинном грибе, паразитирующем на ржи.

Химическое строение α, α -трегалозы, было выяснено в 1888 г., когда после ее гидролиза получили только глюкозу. Нередуцирующая способность этого сахара была известна с момента его открытия и подтверждена стабильностью трегалозы при выдерживании в щелочах. Таким образом, наиболее существенным свойством трегалозы оказалось то, что этот дисахарид состоит из двух молекул D-глюкозы, точнее глюкозных остатков, связанных через их восстановленные атомы углерода (см. формулу).



Структура природного изомера трегалозы

Трегалоза характерна для высших и низших форм жизни, но не для млекопитающих. Большим достижением последних лет является установление факта обнаружения специального гена, участвующего в синтезе трегалозы. Он присутствует у многих организмов, содержащих чрезвычайно низкий уровень трегалозы, затрудняющий ее определение. Это позволяет значительно расширить круг организмов, содержащих трегалозу, и предположить ее наличие у некоторых млекопитающих, тем более, что у человека обнаружена трегалаза (TREN) – фермент, который гидролизует трегалозу в кишечнике и является маркером повреждения почечных канальцев. Всего около 40 лет назад о трегалозе знали только то, что этот сахар выполняет функцию запасного соединения. В настоящее время представления о роли трегалозы значительно расширились, так как было показано, что это соединение принимает участие в наиболее важных метаболических процессах.

Трегалоза синтезируется как стресс-зависимое соединение при действии холода, нагревания, обезвоживания, окисления и других неблагоприятных факторов. Именно в таких ситуациях организм синтезирует большое количество трегалозы, что позволяет ему сохранить целостность клеток. В таких условиях присутствие трегалозы препятствует денатурации белков, что подтверждают современные данные об уменьшении содержания этого дисахарида во время агрегации белков, медирированных полиглутамином. Механизм стабилизации белков был достаточно быстро выяснен, и трегалоза получила название химического шаперона.

Еще в 1991 г. в опытах с муковровым грибом *Cunninghamella japonica* было показано, что в условиях высокотемпературного стресса происходит остановка ростовых процессов и быстрое накопление трегалозы, которое сопровождается изменением липидного состава и увеличением степени ненасыщенности липидов, т.е. была установлена взаимосвязь между синтезом трегалозы и составом липидного бислоя. При этом параллельно с увеличением степени ненасыщенности липидного бислоя происходит увеличение уровня фосфатидилэтаноламина, что, вероятно, способствует более активному росту мицелия после выхода из состояния стресса.

Аналогичный эффект наблюдается при введении антиоксиданта при его добавлении во время действия стрессора. Позднее в опытах с дрожжами при действии на них перекиси водорода, вызывающей окислительное повреждение аминокислот в белках, было показано, что трегалоза способна устранять эти повреждения и защищать клетку от действия свободных радикалов.

Однако механизм защитного действия трегалозы был установлен только в 2003 г. Используя метод ЯМР, были получены спектры ^1H и ^{13}C , позволяющие судить о взаимодействии ОН...п и СН...О между трегалозой и ненасыщенными жирными кислотами. Полученные данные свидетельствуют о том, что трегалоза значительно снижает действие свободнорадикального окисления на ненасыщенные ацилы липидов путем слабого связывания с двойными связями в молекулах жирных кислот. В настоящее время установлено, что трегалоза является источником энергии

и резервным углеводом, стабилизирует и защищает при стрессе белки и мембранные липиды от деградации, препятствует разрушительному действию на биологические структуры свободных радикалов, является регулятором роста и развития растений и служит компонентом гликолипидов у коринебактерий.

Кроме того, показано, что нередуцирующие сахара – трегалоза и сахароза – участвуют в системе коммуникации клеток (гликокоде), и их метаболизм связан с системой клеточных сигналов. Невосстановленный дисахарид трегалоза является общим для спор всех грибов. Трегалоза обнаружена в аскоспорах *Neurospora tetrasperma*, уединиоспорах *Puccinia graminis*, конидиях *Penicillium chrysogenum*, спорах *Dictyostelium discoideum* и *D. mucoroides*, спорах *Phycomyces blakesleeanus* и *Cochliobolus mirabianus*, в конидиях *Cunninghamella japonica*. Как правило, при прорастании споры, элонгации ростовой трубочки и образовании мицелия биосинтез трегалозы не происходит, если в среде присутствуют источники углерода и азота. Как только начинается процесс истощения питательных запасов в среде, у грибов начинается активный синтез трегалозы.

Таким образом, образование трегалозы четко ассоциировано с наступлением неблагоприятных условий существования. Другими словами, при протекании активных ростовых процессов трегалоза не образуется. Как только происходит действие какого-либо неблагоприятного фактора, например, истощение питательной среды, рост останавливается, и начинается накопление в мицелии трегалозы. Если при этом мицелий достиг идиофазы, то происходит процесс спорообразования, и трегалоза накапливается в спорах (у ряда грибов ее количество может составлять 25–30% от веса спор). Таким образом, у грибов синтез трегалозы тесно связан с процессом спорообразования, т.е. с состоянием посевного материала, который используется в биотехнологических разработках.

Проведенные нами исследования (Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.) показали, что у представителей царства Fungi биохимическая адаптация к температурному стрессу (ТС), обусловленная протекторами углеводной природы, различается в зависимости от систематического положения организма. На

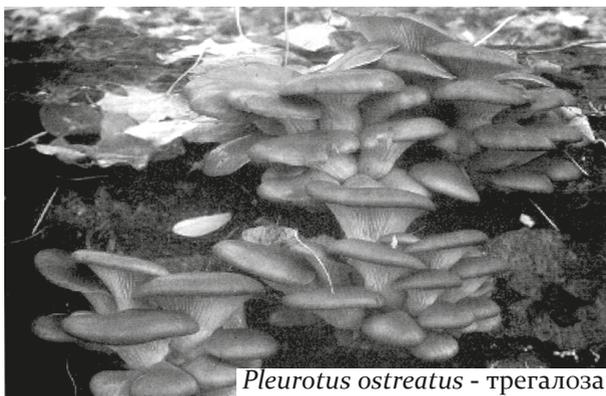
фото указаны основные протекторы в зависимости от видовой принадлежности мицелиального гриба.

У исследованных *Zygomycetes* – *S. japonica* и *Absidia coerulea* работает только один биохимический механизм, основанный на превращении глюкозы в дисахарид трегалозу. Последняя выполняет функцию стабилизатора мембранных липидов и является своеобразным «депо» такого высокоактивного субстрата как глюкоза. Интересно, что только в условиях более глубокого (до 10 °С) охлаждения появляются следы глицерина, а у (–) штамма *V. trispora* в стилоспорах, полученных в условиях гипертермии, обнаруживается полиол инозит.

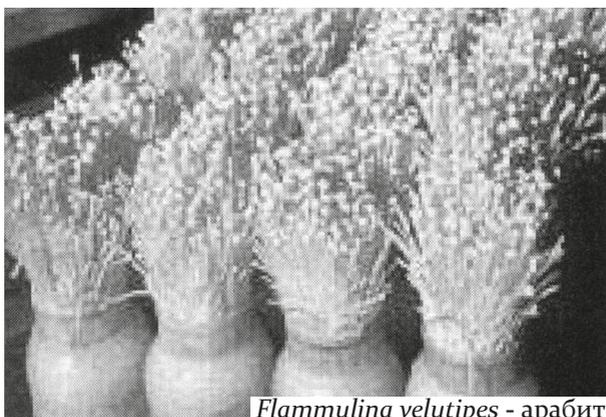
У грибов, принадлежащих к классу *Ascomycetes*, в частности, *Aspergillus japonicus* и *Myceliophthora thermophila* набор углеводов цитозоля более обширен. Кроме трегалозы имеется ряд полиолов, которые также выполняют функцию протекторных соединений. В данном случае при гипертермии отмечается тенденция к увеличению образования трегалозы и инозита, а при гипотермии – маннита и глицерина.

При этом наблюдается интересная особенность, связанная с температурным оптимумом роста организма. У термофила *M. thermophila*, имеющего оптимум роста при 41–42 °С, глицерин не образуется при низкотемпературном шоке, но этот полиол появляется у мезофила *A. japonicus*, выдерживающего более низкую температуру культивирования.

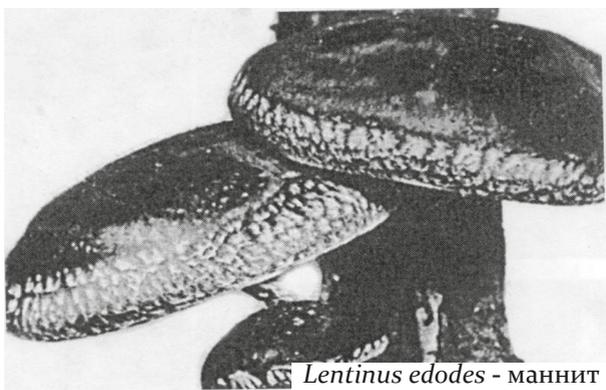
Интересно, что в плодовых телах ряда грибов, в частности, *L. edodes*, преобладает маннит, составляющий до 70% от суммы сахаров. Такое повышение уровня маннита можно объяснить действием холодового шока, индуцирующего плодообразование. Напротив, действие повышенной температуры вызывает накопление трегалозы. Таким образом, температурный стресс является фактором, позволяющим управлять накоплением в клетках грибов определенных углеводов, с составом которых связан, в частности, процесс плодоношения (см. фото справа).



Pleurotus ostreatus - трөгало́за



Flammulina velutipes - ара́бит



Lentinus edodes - ма́ннит

Преобладающий протектор (полиол) в плодовых телах различных видов грибов при стрессе.

Литература

- Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Роль стеринов в морфогенетических процессах и диморфизме грибов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 1. С. 5–18.
- Мысякина И.С., Феофилова Е.П. Липиды в морфогенетических процессах мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. № 3. С. 291–300.
- Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Козлов В.М. Получение из мицелиальных грибов полисахаридных комплексов и определение степени их деацетилирования // Микробиология. 1997. Т. 66. № 1. С. 88–89.
- Феофилова Е.П. Гетероталлизм муконовых грибов: биологическая функция и использование в биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 501–519.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Кочкина Г.А. О филогенетических связях грибов семейства *Chanerphogaceae* с позиций гетероталлизма // Микробиология. 1997. Т. 66. № 6. С. 840–845.
- Barrero A.F., Herrador M.M., Artaega P., Gil J., Gonzales L.-A., Alcalde E., Cerda-Olmedo E. New apocarotenoid and β -caroten cleavage in *Blakeslea trispora* // Organic & Biomolecular Chemistry. 2011. V. 9. P. 7190–7195.
- Gooday G.W. Sporopollenin formation in ascospore wall of *Neurospora crassa* // Arch. Microbiol. 1971. V. 101. P. 145–151.
- Gooday G.W. Hormone of mycelial fungi. The Mycota. Ed. J.G.H. Wessels, F. Meinhardt. Berlin-Heidelberg-London-N.Y.: Springer-Verlag, 1994. V. 1. P. 401–409.
- Hasan H.A. Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction // Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2002. V. 49. № 1. P. 105–118.
- Weete J.D. Lipids in fungal growth and reproduction // The Fungal Spore: Morphogenetic Controls / Eds. Turian G., Hohl H.R. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Acad. Press, 1981. P. 463–486.
- Weete J.D. Structure and function of sterols in fungi // Adv. Lipid Res. 1989. V. 23. P. 115–167.

Глава 3

Цикл развития грибов, вторичный метаболизм и покой

Спора, попадая в благоприятные условия, начинает прорастать, и в этом процессе различают следующие стадии, основанные на морфологических изменениях: набухание споры, образование проростковой трубочки, ее удлинение, образование гифы и ее ветвление. В настоящее время более приняты следующие стадии прорастания: набухание, адгезия, деконденсация ядер, инициирование поляризованного роста, митоз, рост гиф и образование септ. Под термином «спора» у грибов понимается специализированная клетка, образующаяся в результате бесполого или полового процесса. Поэтому в широком смысле спору грибов рассматривают как «начало и конец развития этих организмов». Процесс спорообразования можно представить как определенную стратегию многих организмов (растений, животных, микроорганизмов), позволяющих сохранить геномный материал (*genomic safe house*).

Этот процесс вызывается целым рядом неблагоприятных факторов: голоданием, охлаждением, нагреванием, химическими реагентами, в том числе ядами, а также светом, радиацией и др.

Среди этих физико-химических факторов наиболее распространенным является голодание. Споры в жизненном цикле грибов кроме основной функции (завершения процесса бесполой и половой репродукции) выполняют еще две: обеспечивают способность выживать при наступлении неблагоприятных условий и способствуют распространению вида во внешнем ареале.

После того, как спора прорастает, наступает фаза активного роста. Эту фазу называют трофофазой, т.е. фазой питания. Она

продолжается, пока в среде достаточно питательного субстрата. Как только начинается его истощение, ростовые процессы останавливаются, начинается новый этап развития организма, называемый вторичным метаболизмом, а затем происходит переход к особому состоянию – криптобиозу, скрытой жизни (у грибов его называют покоем). Покой у спор грибов может быть конститутивным (эндогенным) и экзогенным. Для первого характерны такие признаки, как специальные клеточные барьеры для проникновения питательных веществ, образование метаболических блоков, наличие аутоингибиторных соединений. Такое состояние покоя имеет более сложную регуляцию и контролируется на цитоплазматическом уровне, причем в этом процессе участвуют долгоживущие матрицы. Значение этих матриц для процесса цитодифференцировки, влияние на процесс спорогенеза ингибиторов синтеза белка (циклогексимида) и нуклеиновых кислот (актиномицина D) подробно обсуждается в неустаревшей до сих пор книге Харриса (1973).

Второй тип покоя – экзогенный – иногда называют покоем, зависящим целиком от окружающих факторов, среди которых решающим является влажность. Действительно, как только действие неблагоприятного фактора снимается, начинаются процессы вегетативного роста. Это состояние покоя зависит в большинстве случаев от отсутствия воды, и как только спора грибов попадает в водное окружение, и в нее проникает вода, начинаются процессы прорастания. В данном случае дополнительной активации, т.е. обработок теплом, химическими соединениями, нарушающими целостность клеточной оболочки, не требуется.

Ряд авторов вводят еще термин индуцированный покой, или вторичный покой. В качестве примера можно привести урединоспоры *Puccinia graminis tritici*, которым для прорастания необходим термошок, но только после того, как споры этого ржавчинного гриба хранились на холоде.

В фазу подготовки к переходу к покою (эта фаза в развитии грибов называется идиофазой) метаболизм клетки резко меняется, и начинают синтезироваться соединения, необходимые для обеспечения покоя, т.е. процесса спорообразования. У мукоровых грибов это каротиноиды, триспорные кислоты, споро-

полленин. Последний входит в состав клеточной стенки (КС) спор, при этом резко увеличивается синтез хитина и β -глюкана, так что спора хорошо защищена от внешних неблагоприятных воздействий. В спорах грибов содержатся самоингибиторы прорастания, например триметиламины, метил-цис-ферулат (метиловый эфир цис-феруловой кислоты), канавалин.

Как отмечалось выше, в идиофазе резко изменяется метаболизм грибной гифы, и начинают преобладать процессы так называемого вторичного метаболизма. Это явление лежит в основе многих биотехнологических процессов, поэтому мы сочли возможным уделить ему особое внимание. Кроме того, вторичный метаболизм широко распространен среди микроорганизмов, растений и животных, поэтому изучение этого явления представляет собой общебиологическую задачу.

У микроорганизмов вторичный метаболизм обнаруживает специфические черты: в процессе развития культур микробов можно более четко идентифицировать фазу роста (трофофазу) и фазу специализации клеток (идиофазу). В идиофазе происходит синтез специальных соединений – гормонов, антибиотиков, токсинов, некоторых пигментов, алкалоидов и др., – называемых вторичными метаболитами.

Согласно современным представлениям, к вторичным метаболитам относят соединения, обладающие следующими признаками: узкой видовой специфичностью, большим разнообразием химического строения, способностью синтезироваться культурами микроорганизмов при определенных условиях культивирования и на определенных фазах их развития. Синтез вторичных метаболитов происходит на фоне глубоких изменений клеточного метаболизма, является выражением клеточной специализации и зависит от дифференциальной экспрессии генов.

Вторичный метаболизм представляет собой характерную особенность общего обмена клеток, обусловлен генетически и осуществляется специфическими ферментами. Синтез вторичных соединений регулируется синтазами, которые репрессированы в период активного роста культур микроорганизмов. Данные последних лет позволяют предположить, что в образовании вторичных метаболитов не участвуют некоторые контрольные

механизмы (например, регуляция нуклеозидполифосфатами), координирующие синтез первичных метаболитов. В то же время обнаружены уникальные механизмы синтеза вторичных соединений, не свойственные первичному обмену. Большое значение имеет компартиментализация вторичных метаболитов, так как пространственное расположение в клетке этих соединений является одним из важных контрольных механизмов во вторичном метаболизме. В этом плане значительный интерес представляет исследование биологических реакций, с помощью которых вторичные метаболиты удерживаются в специальных компартментах.

Вторичные метаболиты выполняют у микроорганизмов разнообразные функции и тесно связаны с первичным обменом. Ранее считали, что биологическая роль вторичных продуктов, в частности антибиотиков, сводится к «биологическому оружию» микробной клетки в борьбе с конкурирующими видами. В последние годы синтез вторичных метаболитов рассматривается как механизм, способствующий биохимической эволюции видов и увеличивающий их возможность адаптироваться и выживать при изменении окружающих условий, в частности, при стрессе и образовании покоящихся клеток. Например, β -каротин (вторичный метаболит) подвергается процессу окислительной полимеризации с образованием спорополленина, который входит в состав оболочки спор муковых грибов.

Необходимо отметить, что фундаментом, на котором возникло учение о вторичном метаболизме у микроорганизмов, послужили работы академика В.Н. Шапошникова и его учеников о взаимосвязи процессов сбраживания с конструктивным обменом и о двухфазности в обмене веществ у микроорганизмов. Впервые В.Н. Шапошников на примере ацетонобутилового брожения показал, что организм в фазе роста – трофофазе (или по терминологии В.И. Шапошникова – I фазе) по метаболизму резко отличается от того же организма, но в идиофазе (II фаза).

Феномен двухфазности был впервые обнаружен на примере ацетонобутилового брожения *Clostridium acetobutylicum* при организации в г. Грозном завода по производству ацетона и бутанола. Сущность этого процесса состояла в следующем. В фазе

I наблюдается интенсивное накопление биомассы бактерий и образование уксусной и масляной кислот. Далее происходит резкое падение кислотности в среде выращивания и переход в фазу II, связанную с падением численности бактерий и образованием совершенно других продуктов – ацетона, этанола и бутанола. В более поздних исследованиях двухфазность была установлена при образовании антибиотиков у актиномицетов и мицелиальных грибов. Так был установлен ряд закономерностей, которые в последствии легли в основу классической биотехнологии.

Суть их состояла в следующем:

- активный рост биомассы (или, как это стали называть позднее, стадия «биоза») сопровождается образованием специфических метаболитов, например, синтетических интермедиатов и ключевых соединений, таких как белки и ДНК, резко отличающихся от продуктов второй фазы;
- после активного роста начинается остановка процессов пролиферации с последующим автолизом клетки и образованием новых продуктов, возникающих в результате измененного метаболизма.

В современной биотехнологии на этом явлении основаны многие биотехнологические производства, например, антибиотиков, лимонной кислоты, получения каротиноидов, гормонов и других соединений, которые можно получить только в фазу II развития грибов. Через несколько лет после открытия двухфазности процессов брожения эта закономерность начала широко обсуждаться за рубежом, была опубликована основополагающая статья Бу'Лока (Bu'Lock), и были введены новые термины – вторичный метаболизм, трофофаза и идиофаза – без ссылки на работу В.Н. Шапошникова и его учеников о двухфазности процессов брожения.

Практическое значение вторичных метаболитов трудно переоценить. Особого внимания заслуживает тот факт, что ряд закономерностей этого процесса можно перенести на культуры тканей животных и растений, причем особый интерес в этом отношении представляют ткани меланомы. В животноводстве широко применяются ростстимулирующие препараты акти-

номицетного происхождения, например, давно используются кормогризин, витаминин и кормарин. Вторичные метаболиты грибов находят применение в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных растений. Радиклоновая кислота, получаемая из низших грибов, значительно ускоряет рост проростков риса и китайской капусты. α -Гормон *Saccharomyces cerevisiae* вызывает усиление роста овса за счет ускорения удлинения колеоптиля.

Особое значение имеют вторичные метаболиты изопреноидной структуры – убихиноны, изучение кинетики образования которых у грибов позволяет отнести их к вторичным метаболитам. Обнаружено, в частности, что гексагидроубихинон-4 оказывает профилактическое действие при пищевой дистрофии у обезьян. Это позволяет применять убихиноны при особой форме анемии, вызываемой белковым голоданием. Большое значение в медицине и сельском хозяйстве имеют каротиноиды – ликопин, лютеин, зеаксантин и др. Способы их получения и практическая значимость приведены дальше (Часть 3, разд. 2.1.)

Литература

- Беккер М.Е., Дамберг Б.Е., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: «ЗИНАТНЕ», 1981. 253 с.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 349 с.
- Голдовский А.М. Анабиоз и его практическое значение. Л.: Наука, 1986. 169 с.
- Коломийцева И.К. Липиды в гибернации и искусственном гипобиозе млекопитающих // Биохимия. 2011. Т. 76. № 12. С. 1604–1614.
- Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз. М.: Наука, 1990. 182 с.
- Феофилова Е.П. Гетероталлизм муковых грибов: биологическое значение и использование в биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 501–519.
- Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М.: Мир, 1973. 185 с.
- Шапошников В.Н. Физиология обмена веществ микроорганизмов в связи с эволюцией функций. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 156 с.
- BuLock J.D. The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. London–Toronto–Sydney: MacGrow-Hill Publishing Company Limited, 1965. 210 p.

Глава 4

Диморфизм у грибов и факторы, оказывающие влияние на морфогенез

Диморфизм определяет жизненную стратегию грибов путем образования клеток альтернативных морфотипов, обеспечивающих рост и выживание культуры в различных (в том числе стрессовых) условиях. Для диморфных грибов характерно образование двух морфологических форм – мицелиальной и дрожжеподобной. Их наиболее существенные различия обусловлены структурой и механизмами формирования клеточной стенки, а также характером роста клетки (апикальным или сферическим).

Проявление диморфизма у грибов сопряжено с существенными изменениями биосинтетических и энергетических процессов и структурно-морфологических характеристик, что имеет адаптивный характер и направлено на поддержание жизнеспособности организма в изменившихся условиях. Морфогенетический ответ грибов вызывают многие факторы окружающей среды, среди которых основными считаются наличие сбраживаемой гексозы и анаэробная атмосфера, способствующие развитию дрожжеподобных клеток, а присутствие кислорода обычно благоприятно для развития мицелия.

В последние годы интерес к изучению диморфизма грибов возрос благодаря тому, что этот феномен связан с широким распространением возбудителей микозов животных и человека и патогенов сельскохозяйственных растений. Мицелиальная и дрожжевая формы диморфных грибов, многие из которых являются патогенными, имеют разную вирулентность. Наибольшую значимость для человека имеют вызывающие оппортунистические микозы аскомицетные и базидиомицетные грибы,

такие как *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitania*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, а также фитопатогенные грибы *Ustilago maydis*, *Colletotrichum* sp., *Magnaporthe grisea* и др. У большинства грибов мицелиальная форма необходима для инвазии в организм хозяина, а дрожжеподобная форма более устойчива к антибиотикам, повышенным температурам и кислотности, а также к низкому содержанию кислорода в среде. Мукоровые грибы, у которых и было впервые открыто явление диморфизма, являются классической моделью для исследований. Хотя в своем большинстве они не патогенны, отдельные виды в определенных условиях также могут вызывать оппортунистические инфекции – мукормикозы разной локализации, при этом патогенной формой гриба является мицелиальная.

Принято считать, что морфогенез грибов сводится к форме клетки, которая определяется составом и строением клеточной стенки. Клеточные стенки гиф мицелия не имеют выраженных слоев, они более плотные, менее волокнистые, чем клеточные стенки дрожжеподобных клеток. Соответственно, дрожжеподобные клетки характеризуются более толстыми и рыхлыми клеточными стенками с двумя хорошо различимыми слоями.

Главным структурным компонентом клеточных стенок (КС) гиф и дрожжеподобных клеток мукоровых грибов являются фибриллы хитина и хитозана, погруженные в матрикс полиуронидов мукорана и мукоровой кислоты, гликопротеины и гликопептиды. Основные различия КС двух морфологических форм касаются, главным образом, содержания маннозы и белка – главных компонентов мукоранового матрикса, уровень которых выше в дрожжеподобных клетках, и фукозо- и галактозо-содержащих полимеров, в большем количестве содержащихся в мицелиальных КС.

Отложение материала новой КС при сферическом (дрожжеподобном) росте происходит диффузной интеркаляцией по всей поверхности клетки, а для растущего мицелия характерно апикальное отложение нового материала. Исследование синтеза хитина и хитозана *in vivo* по результатам включения N-ацетил-D-[³H]-глюкозамина в полимеры показало, что их биосинтез в

мицелии осуществляется с гораздо более высокой скоростью, чем в дрожжеподобных клетках. Также показано, что в мицелии содержится больше хитина, чем в дрожжеподобных клетках.

Кроме компонентов КС в определении формы клеток принимают участие компоненты цитоскелета – актин и тубулин.

Помимо таких природных морфопоэтических факторов, как глюкоза, CO_2 , N_2 , сывороточные факторы, температура, в исследованиях по влиянию на характер роста муковых грибов используются синтетические соединения, которые вызывают сходный эффект, однако механизмы действия которых различны. Среди них вещества, ингибирующие митохондриальные процессы транспорта электронов (цианид, антимицин А) и окислительного фосфорилирования (олигомицин), токсические соединения (хлоранилины), хлорамфеникол, различные азолы – ингибиторы биосинтеза стерина, циклолейцин – ингибитор S-аденозилдеметилазы. Показано, что блокирование синтеза фосфолипидов полиеновым антибиотиком церуленином, ингибирующим синтетазу жирных кислот, предотвращает образование мицелия. Кроме того, известно, что уровень pH регулирует многие физиологические процессы, влияющие на морфологию и проявление диморфизма у различных грибов, таких как *Aspergillus nidulans*, *Fusarium* sp., *Candida albicans*, *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus*.

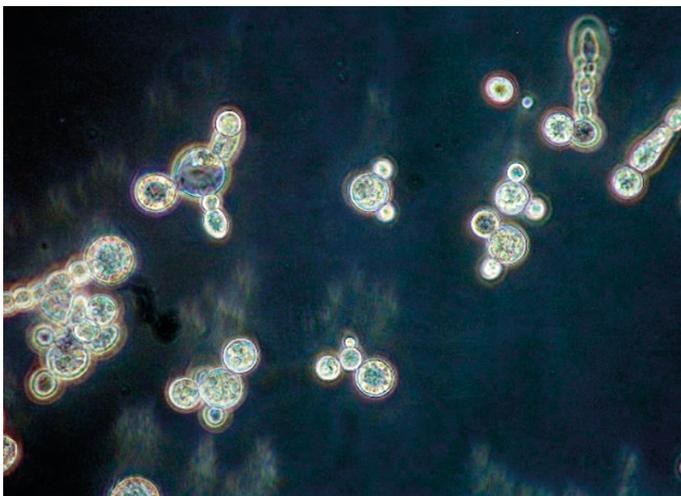
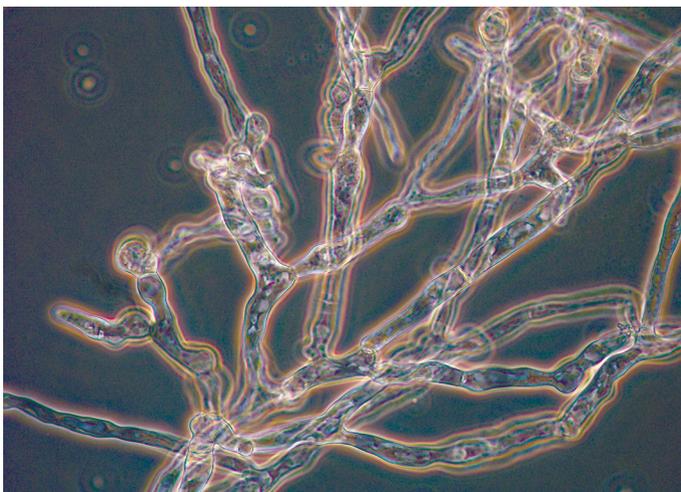
Мицелий и дрожжеподобные клетки характеризуются существенными метаболическими различиями, например, в энергетическом метаболизме (дыхание и брожение), углеродном метаболизме (более высокие активности ферментов цикла трикарбоновых кислот в мицелии и ферментов глиоксилатного цикла у дрожжеподобных клеток), азотном метаболизме (в дрожжеподобной форме активность НАД- и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы ниже, чем в мицелиальной), а также в составе липидов.

В регуляции морфологических переходов мицелий–дрожжеподобные клетки принимают участие различные эндогенные регуляторы. Циклический АМФ является эффектором цАМФ-зависимых протеинкиназ у многих дрожжей и грибов, которые участвуют в передаче сигнала, регулируют характер роста и в

значительной степени определяют физиологический и морфогенетический ответ на изменения внешней среды, а также вирулентность. Полиамины (спермин, спермидин, путресцин) – поливалентные органические катионы, принимают участие в регуляции транскрипции и трансляции, и их внутриклеточный уровень быстро возрастает во время морфологических переходов. S-аденозилметионин (SAM) является универсальным донором метильных групп у всех организмов, в том числе у грибов. Его уровень регулируется активностью SAM-синтетазы и оказывает влияние на морфогенетические процессы, участвуя в метилировании клеточных белков.

У грибов имеют отношение к диморфизму 2 главных пути передачи сигнала: с участием активируемой митогеном протеинкиназы (МАПК-путь) и цАМФ-зависимой протеинкиназы А (ПКА-путь), которые существенно влияют на проявление диморфизма и вирулентность. Основные исследования проводятся на моделях *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Ustilago maydis*, *Magnaporthe grisea*. Трансмембранная передача сигнала может осуществляться через ионные каналы, рецепторные киназы или через рецептор-активируемый эффекторный фермент, который образует внутриклеточные вторичные мессенджеры. Так как эффекторные ферменты локализованы на поверхности клетки, мессенджеры часто образуются из мембранных компонентов, основную массу которых составляют фосфолипиды. Мессенджер передает сигнал киназам в различные каскады, затем активируются факторы транскрипции и синтез белков, формируя, таким образом, физиологический ответ, который может быть задействован в процессе морфогенетической дифференцировки или других клеточных процессах.

Известно участие в контроле морфологических переходов (мицелий – дрожжеподобные клетки) не только мембранных фосфолипидов, но и стеринов, а также регуляторных липидов, не выполняющих структурной функции. Имеются сведения, что жирные кислоты также могут участвовать в регуляции морфологических переходов у диморфных грибов, связанных с вирулентностью и отношениями хозяин – паразит.



Мицелиальная (вверху) и дрожжеподобная (внизу) формы гриба *Mucor hiemalis*.

Таким образом, явление диморфизма, вызываемое большим числом различных факторов, сопровождается изменениями практически всех биосинтетических и энергетических процессов, которые ведут за собой структурно-морфологические изменения, имеющие адаптивный характер и направленные на поддержание жизнеспособности в изменившихся условиях.

Процесс диморфной транзиции у грибов, значимых как в медицинском, так и в биотехнологическом аспектах, имеет глубокий биохимический, экологический и адаптационный смысл. Исследование влияния различных внешних и внутренних факторов на морфогенез позволяет не только контролировать процессы роста и пролиферации у возбудителей микозов, но также регулировать реализацию биотехнологического потенциала грибов: для повышения эффективности штаммов-продуцентов и разработки условий, способствующих мелкодисперсному росту при сохранении высоких показателей выхода целевых продуктов.

Таким образом, исследования диморфизма грибов представляют не только теоретический интерес, но и имеют большое значение для современной медицины, ветеринарии и сельского хозяйства.

Литература

- Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Особенности метаболических процессов и состав липидов дрожжеподобных клеток и мицелия *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* ИНМИ при высоком содержании глюкозы в среде // Микробиология. 2008. Т. 77. № 4. С. 460–464.
- Мысякина И.С. Бокарева Д.А., Усов А.И., Феофилова Е.П. Различия в составе углеводов дрожжеподобных клеток и мицелия *Mucor hiemalis* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 443–446.
- Bartnicki-Garcia S., Lippman E. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii* // Science. 1969. V. 165. P. 302–304.
- Domek D.B., Borgia P.T. Changes in the rate of chitin-plus-chitosan synthesis accompany morphogenesis of *Mucor racemosus* // J. Bacteriol. 1981. V. 146. P. 945–951.
- Gancedo J.M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. P. 107–123.
- Inderlied C.B., Sypherd P.S. Glucose metabolism and dimorphism in *Mucor* // J. Bacteriol. 1978. V. 133. P. 1282–1286.
- Ito E., Cihlar R.L., Inderlied C.D. Lipid synthesis during morphogenesis in *Mucor racemosus* // J. Bacteriol. 1982. V. 152. P. 880–887.
- Jensen E.C., Ogg C., Nickerson K.W. Lipoxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi* // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 8. P. 2505–2508.

- Klose J., de Sa M.M., Kronstad J.W. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis* // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. № 3. P. 823–835.
- Kobayashi S.D., Cutler J.E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? // Trends Microbiol. 1998. V. 6. P. 92–94.
- Kolattukudy P.E., Rogers L.M., Li D., Hwang C.S., Flaishman M.A. Surface signaling in pathogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4080–4087.
- Kumar C.P., Menon T., Sundararajan T., Nalini S., Thirunarayan M.A., Rajasekaran S., Venkatesikal M. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts // Rev. Iberoam Mycol. 2006. V. 23. № 2. P. 101–103.
- Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Souza C., Harashima T., Wei-Chiang Shen, Ping Wang, Xuewen Pan, Waugh M., Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence // Microbiol. Mol. Biol. Revs. 2000. V. 64. № 4. P. 746–785.
- Madhani H.D., Fink G.R. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi // Trends in Cell Biol. 1998. V. 8. P. 348–353.
- Noverr M.C., Huffnagle G.B. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites // Infect. Immun. 2004. V. 72. № 11. P. 6206–6210.
- Orlowski M. *Mucor* dimorphism // Microbiol. Rev. 1991. V. 55. № 2. P. 234–258.
- Pereyra E., Ingerfeld M., Anderson N., Jackson S.L., Moreno S. *Mucor rouxii* ultrastructure: cyclic AMP and actin cytoskeleton // Protozoology. 2006. V. 228. № 4. P. 189–199.
- Vanden Bossche H. Importance and role of sterols in fungal membranes // Biochemistry of cell walls and membranes in fungi / Eds. Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W., Copping L.G. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag, 1990. P. 135–157.

Глава 5

Современные представления о стрессе и его использование в биотехнологии

Стресс (от англ. stress – давление, напор, гнёт, нагрузка, напряжение) неспецифическая (общая) реакция организма на воздействие, которое нарушает его гомеостаз. Ввел этот термин канадский врач Г. Селье, который писал в своей книге «Стресс без дистресса», вышедшей в 1982 г., что стресс есть жизнь, а жизнь есть стресс.

Общим для всех организмов является то, что под действием стресса резко останавливаются ростовые процессы и размножение и полностью изменяется метаболизм.

Согласно современным представлениям, под действием стресса организм проходит следующие 3 стадии:

- (1) стадия тревоги или ошеломления, которое длится очень недолго (секунды или даже наносекунды); в течение этой стадии вырабатывается программа противостояния стрессу, но резистентность оказывается ниже нормы;
- (2) далее наступает стадия адаптации, или резистентность, при этом сопротивляемость организма возрастает; и, наконец,
- (3) выход из стресса в стадию гомеостаза, если стресс не оказался летальным.

Интересно отметить, что живые организмы, в принципе, придерживаются двух типов стратегии выживания. Первый тип, наименее распространенный в природе, формулирует свою стратегию – выживаю, сопротивляясь стрессу. К этому типу стратегии выживания относятся, в основном, млекопитающие, в том числе человек. Этим организмам, которые активно борются со стрессом, например с низкой температурой, приходится

искусственно создавать условия, необходимые для выживания (строить убежища от холода, иметь теплую одежду и т.д.)

Вторая стратегия, называемая пассивной, состоит в том, что организм, спасаясь от стресса, переходит в неактивное состояние, так называемую «скрытую жизнь» (криптобиоз), превращаясь в случае микроорганизмов в специализированные клетки, называемые покоящимися (например хламидоспоры).

В настоящее время мы мало знаем о том, как сигнал о действии неблагоприятного фактора передается у грибов внутрь клетки. Но, по аналогии с другими эукариотами, можно предположить, что в КС, как и в плазматической мембране, трансдукция сигнала осуществляется особыми белками-рецепторами. В этом процессе участвует Ca^{2+} как вторичный мессенджер, система инозитольных фосфолипидов, оксид азота, система активных форм кислорода (АФК), происходит ингибирование или активация протеинкиназ или фосфатаз, и изменяется фосфорилированное состояние внутриклеточных белков.

Значительное затруднение представляет отсутствие данных о строении плазматической мембраны грибов и ее отличиях (если они есть) от высших эукариотов. Тем не менее накоплено достаточно данных об изменениях в химическом составе липидного бислоя при действии стрессорных факторов, и следует особо отметить роль физического состояния мембран и их химического состава в биохимической адаптации грибов к стрессовым воздействиям.

Если популяция попадает в неблагоприятные условия (чаще всего это голод), то ростовые процессы останавливаются, и происходит изменение метаболизма клеток. Это создает условия для возникновения особых мутаций, чтобы адаптировать клетку к какому-то новому субстрату. Такой механизм получил название адаптивных мутаций. В таких неделящихся клетках идет необычный синтез ДНК: удаляется один из участков нити ДНК, и в итоге происходит накопление мутаций, которые с большой частотой накапливаются в неделящихся клетках; их называют гипермутациями. При этом накопление таких мутаций происходит только в субпопуляции, т.е. малой части нерастущих клеток (полагают, что гипермутирующих клеток – одна на миллион).

Объектом изучения молекулярной природы адаптивных процессов была, в основном, кишечная палочка *Escherichia coli* (классический объект), у дрожжевых организмов – *Saccharomyces cerevisiae*, у мицелиальных грибов – представители порядка Mucorales. У последних значительно меньше известно об уровнях организации адаптивных реакций, в частности, об уровнях генной экспрессии механизмов транскрипционной регуляции адаптивных генов. Однако, несмотря на многообразие механизмов адаптации к различным видам стрессорных воздействий, можно выделить основные, действующие при любом виде стресса, причем наиболее эффективная регуляция адаптивных процессов происходит на уровне трансляции, транскрипции и стабилизации молекул белков.

Какое же значение имеет стресс для биотехнологии грибных производств? Выше был приведен пример с гиперсинтетиком липидов мукоровым грибом *S. japonica*. Популяция клеток, выдержавшая тепловой стресс, при культивировании при оптимальной температуре стала активнее расти и образовывала бóльшую биомассу. В грибоводстве известен прием, когда понижение температуры становится фактором, вызывающим плодоношение. Выдерживание базидиоспор *Agaricus bisporus* при низкой температуре способствует увеличению всхожести на 15–20%. Выше отмечалось, что при стрессе происходит торможение жизненной активности (ТЖА).

Однако при действии определенных стрессоров, например, при недостатке в среде фосфора, наблюдается еще один механизм адаптации – образование специфических липидов. Так, И.В. Конова с соавт. показала, что у гриба *B. trispora*, выращенного при дефиците фосфора, наблюдается появление двух новых гликолипидов; кроме того, значительная часть полярной фракции – 29,1% – составляют гликолипиды (а не фосфолипиды), один из которых имеет хроматографическую подвижность, совпадающую со стандартным препаратом цереброзида.

Такая лабильность состава полярных липидов наблюдается не только у грибов, но и у прокариот. Например, у актиномицетов при недостатке фосфора происходит замена фосфолипидов орнитингликолипидом или гликолипидами – у псевдомонад.

У грибов – симбионтов лишайника – при окислительном стрессе обнаружено увеличение содержания бетаинового липида (диацилглицеротриметилсерина); бетаиновые липиды обнаруживаются и у некоторых базидиомицетов при стрессе, причем одновременно снижается уровень ФХ.

Согласно современным представлениям, физическое состояние мембран контролирует экспрессию белков теплового шока (БТШ) и других генов. Общепринято считать, что синтез БТШ коррелирует с индукцией устойчивости к тепловому шоку и ряду других стрессовых воздействий, за исключением холодового шока. Предполагается, что эти стресс-белки выполняют функции деградации и реактивации белков, поврежденных при стрессовых воздействиях. Несмотря на это практически общепринятое мнение об участии БТШ в формировании термоустойчивости (ТУ), накапливаются данные о том, что, например, у *S. cerevisiae* стресс-белки не играют определяющей роли в возникновении устойчивости к повышенной температуре.

Для выживания при высоких температурах у дрожжей основу защиты от стресса составляет убиквитин. Предполагают также, что ТУ связана с малыми цитоплазматическими РНК (G8 РНК), которые необходимы для селективной трансляции мРНК в условиях стресса. Более вероятно, что термоустойчивость у грибов связана с полиоксиуглеводами и сахарами (трегалозой и сахарозой), особенно с дисахаридом трегалозой (см. в главе 2, разд. 2.5. о роли трегалозы у грибов).

Возникает вопрос, какова роль стресса на организменном уровне или на уровне популяции? Другими словами, стресс – это плохо или он необходим? Сейчас все свободно рассуждают о стрессе на бытовом уровне. Считается, что все болезни, смерть и т.д. – от стресса. Но что было бы с эволюцией видов без стресса, и жизнь продолжалась бы в гомеостазе?

Вот один из примеров: муковорый гриб *Cunninghamella japonica* подвергли в конце стадии трофофазы кратковременному действию повышенной (но не летальной) температуры. Происходит быстрая остановка ростовых процессов, уровень биомассы мицелия становится значительно меньше, чем в контроле. Но, как только температурный стресс заменяется культивированием

при нормальной температуре, а культура переносится на свежую среду, начинается активный рост мицелия, значительно превышающий рост в контрольной культуре. Значит со стрессом, если он не летальный, не все так просто: хорошо или плохо. Сейчас мы знаем, что происходит при стрессе на популяционном уровне. В этом случае следует исходить из предположения, что скорость мутагенеза при гомеостазе недостаточна для эволюционного процесса, и именно стресс становится ускорителем эволюции.

Липидному составу мембран, в частности, количеству ненасыщенных жирных кислот (НЖК) и динамике мембранных липидов уделяется в последнее время особое внимание. Изменения в окружающей среде или патологическое состояние клетки вызывают модификации в мембранных структурах и, соответственно, потерю ряда физиологических функций. Однако клетка компенсирует эти повреждения, используя биохимические механизмы гомовязкостной или гомофазной адаптации, которые позволяют поддерживать гомеостатическое равновесие.

Укажем теперь, какие изменения наблюдаются в липидном бислое при действии стрессора. Это модификации в составе ацильных цепей липидов. Они отмечаются у грибов в:

- степени ненасыщенности липидного бислоя, что осуществляется за счет десатураз и проявляется в увеличении доли насыщенных или ненасыщенных жирных кислот;
- длине ацильных цепей липидов, при этом существенное значение имеет число четных и нечетных атомов углерода;
- конфигурации ацильных цепей (цис-транс-изомеризация);
- ветвлении ацильных цепей (образование изо- и антеизо-жирных кислот – процесс, свойственный, в основном, прокариотам, но наблюдаемый также и у некоторых грибов).

Следует отметить, что, согласно современным представлениям, основным триггером в этих изменениях ацильных цепей являются изменения в конфигурации мембран и переход от ламеллярной фазы, где ацильные цепи липидов находятся в фазе геля, к жидкокристаллическому состоянию или неламеллярной H_1 -фазе, которая характеризуется цилиндрами липидов, у которых полярные группы оказываются поверхностно расположенными (гексагональная фаза).

Действие стрессора приводит также к изменениям в составе мембранных липидов, в соотношении фосфолипидов (ФЛ) и стерина (Ст), а также в соотношении Ст и эфиров стерина (ЭСт). Так, клеточные рецепторы к лизофосфолипидам являются промоторами сигнальных эффектов. Значительные модификации отмечаются в количестве и составе нейтральных липидов. В данном случае имеются в виду биохимические механизмы, позволяющие использовать для синтеза жирных кислот запасные триацилглицерины (путем их гидролиза).

В последние годы в адаптационных процессах большое значение придают гликолипидам. Так, сфингозин-1-фосфат регулирует рост клеток, является сигнальной молекулой, ингибирует программируемую клеточную смерть, опосредованную церамидом. Сфинголипиды, в частности, C_{18} -дигидросфингозин и C_{18} -фитосфингозин, являются потенциальными стресс-сигналами у дрожжей *Saccharomyces* при тепловом стрессе.

При воздействии стрессора, в частности высокой температуры, для выживания организмов большое значение имеют специальные белки, образуемые в клетках при нарушении гомеостаза. Такие белки, образуемые, например, при тепловом воздействии, назвали белками теплового шока – БТШ (HSPs). Впервые они были обнаружены у насекомых *Drosophila* более 30 лет назад. Последующие исследования позволили установить ряд основополагающих закономерностей о свойствах БТШ. Оказалось, что эти белки синтезируются у животных, растений, грибов и бактерий при действии высокой температуры, причем, как только в организме начинается синтез БТШ, образование остальных белков, участвующих, например, в ростовых процессах, резко ингибируется. Однако синтез этих белков обратим, и при снятии действия стрессора и перехода в гомеостаз образование БТШ прекращается.

Наиболее изученными белками, образующимися при тепловом шоке, являются белки с молекулярной массой 70, 60 и 90 кДа. Функции БТШ, кроме репаративной, полностью еще до конца не изучены. Вероятно, что они могут участвовать в процессах пролиферации и цитодифференцировки. Наиболее интересное предположение состоит в том, что эти белки могут быть иммуно-

генами и защищать хозяина от проникновения микроорганизмов. Для биотехнологии оказалось важным наблюдение о том, что клетки, подвергнутые предварительно действию теплового нелетального шока, обнаруживают способность выживать при действии высоких температур. Этот феномен получил название приобретенной термоустойчивости, и применяется в некоторых биотехнологических производствах, так как обеспечивает лучшую сохранность посевного материала.

Вообще же феномен стресса, а именно состояние ТЖА, широко используется в настоящее время в биотехнологии. Это особое состояние клеток, когда жизненные процессы – рост и размножение – заторможены, и нет процессов первичного активного метаболизма – применяется для консервации тканей, органов и культур, микроорганизмов, а также в создании банков геномов, позволяющих сохранять при существующих темпах освоения Земли генетическое разнообразие животного и растительного мира. Изучение анабиотических состояний клеток находит в настоящее время применение в таких неожиданных отраслях человеческой деятельности, как сохранение памятников культуры на пергаменте и коже.

В данном случае, варьируя условия влажности в хранилищах, можно остановить разрушительную деятельность бактерии рода *Bacillus*, которые при снижении содержания в клетке неподвижной связанной воды до 7 – 13% образуют метаболически неактивные, устойчивые к обезвоживанию формы. Ангидробактериальное состояние винных дрожжей нашло применение для приготовления активных сухих заквасок, используемых в виноделии. В 1979 г. впервые для спасения гибнущих растений был предложен метод хранения семян, меристем побегов и клеток *in vitro* при температуре жидкого азота.

Криоконсервация полностью исключала метаболические процессы, обеспечивало анабиотическое состояние и успешную криоконсервацию семян-микробиотиков, например, таких как семена орхидных. Изучение закономерностей прорастания акинет цианобактерий имеет большое значение для определения сроков «цветения» водоемов. Отмечая прикладное значение феномена ТЖА, следует подчеркнуть актуальность этой

проблемы при освоении северных территорий с огромными пространствами вечной мерзлоты и грядущее освоение космических пространств, где можно ожидать необычайно низкие температуры.

Особое значение ТЖА приобретает в современной биотехнологии, в частности, при хранении и приготовлении активного посевного спорowego материала. И в данном случае несомненное значение имеют результаты исследований о протекторных углеводах, составе липидов и соотношении свободной и связанной воды в покоящихся клетках и уровне их влажности. Воздействие на споры микроорганизмов низких температур увеличивает выход конечного продукта, в частности антибиотиков, а также улучшает качество винной продукции, а у семян – повышает урожайность сельскохозяйственных культур и содержание в них сахаров.

Литература

- Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. М.: Медицина, 2003. 136 с.
- Головлев Е.Л. Метастабильность фенотипа у бактерий // Микробиология. 1998. Т. 59. № 2. С. 149–155.
- Евстигнеева З.Г., Соловьева Н.А., Сидельникова Л.И. Структура и функции шаперонов и шаперонинов // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 1. С. 3–18.
- Скулачев В.П. Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика. М.: Изд-во МГУ, 2012. 368 с.
- Терешина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р., Феофилова Е.П. Состав мембранных липидов и протекторных углеводов мицелиального гриба *Aspergillus niger* при различных тепловых воздействиях // Современная микология в России. Т. 2. Тезисы докладов второго съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 146.
- Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 268 с.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Хохлова Н.С. О различных механизмах биохимической адаптации к температурному стрессу: изменения в составе липидов // Микробиология. 2000. Т. 69. № 5. С. 612–619.

- Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 5–24.
- Феофилова Е.П. Биохимическая адаптация мицелиальных грибов к стрессовым воздействиям // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Юбилейный сборник к 70-летию Института / Отв. ред. В.Ф. Гальченко. М.: Наука, 2004. С. 397–409.
- Хочачка А., Сомеро Д. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
- Хукстра Ф.А., Головина Е.А. Поведение мембран при дегидратации и устойчивость ангидробиотических организмов к обезвоживанию // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 3. С. 347–361.
- Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1938. 144 с.
- Lindquist S. The heat-shock response // Ann. Rev. Biochem. 1996. V. 55. P. 1151 – 1191.

Часть II
Прогресс в области
экспериментальной микологии
как основа для создания
инновационных биотехнологий
по получению лекарственных
препаратов

Глава 1

Краткая история биотехнологии в России и значение грибных производств для человеческого социума

В связи с тем, что настоящая книга посвящена получению лекарственных препаратов из грибов биотехнологическим способом, мы сочли целесообразным ввести раздел, в котором наряду с краткой историей становления биотехнологии и ее современным состоянием приводятся данные о все возрастающей роли грибов в ряде производственных процессов, в том числе, в получении биомедицинских препаратов.

Термин «биотехнология» появился в СССР в языке ученых в начале 80-х годов прошлого столетия, и в то время этого термина еще не было даже в издании Большой советской энциклопедии. Определение этой новой тогда науки появилось несколько позднее. В его основе во всех случаях лежит классическое определение, данное еще в 1985 г. академиком Ю.А. Овчинниковым.

В современном звучании биотехнология – это производство, основанное на последних достижениях современной науки: физико-химии ферментов, генетической инженерии, молекулярной диагностики, генетики, микробиологии, химии антибиотиков, комбинаторной химии. Из этого определения следует, что биотехнологию можно определить, как промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.

Биотехнологию называют особой наукой. Прежде всего, это междисциплинарная область научно-технического прогресса, и в основе биотехнологии лежат последние достижения биологи-

ческих, химических и технических наук. Производственные процессы, используемые в биотехнологии, многоступенчатны и требуют привлечения ученых самых разных специальностей – химиков, генетиков, биохимиков, микробиологов, микологов, а в последние годы особое значение в биотехнологических процессах получила компьютерная техника и создание новых конструкций ферментов. Отличительной чертой этой науки является еще и то, что здесь, как ни в каких других производственных процессах, требуются кадры самой высокой квалификации. Особенно это относится к уровню специалистов, работающих с производственными штаммами микроорганизмов, культур клеток и тканей, что значительно определяет успех производственного процесса и выхода конечного продукта.

Биотехнология – приоритетная наука. Это единственное направление, которое Организация Объединенных Наций официально признала технологией XXI века.

Биотехнология развивается стремительно, как ни одна наука, и это привело в последние годы к дифференциации биотехнологии на ряд определенных направлений. Так, после 2000 г. частью биотехнологии стала «белая» химия на базе возобновляемых ресурсов, позже появился термин «зеленая» биотехнология – сельскохозяйственная, а после 2007 г. «красная» – медицинская. Мы можем ожидать появления еще одного направления в биотехнологии – «черной» биотехнологии, которая сейчас становится очень важной в связи с заметной активизацией жизнедеятельности мицелиальных грибов, особенно аскомицетных, активно портящих продукты в пищевых производствах, разрушающих книги, бумагу, памятники, фотоматериалы, обои, постройки и т.д.

Биотехнологию можно считать и очень старой, и очень молодой наукой. Первая точка зрения основана на том, что в основе биотехнологии лежат древние микробиологические процессы, например хлебопечение, приготовление кисломолочных продуктов, виноделие, квашение (изготовление кислой капусты) и т.д. Можно считать, что начало теоретических основ биотехнологии было заложено Луи Пастером в середине XIX в. в его учении о микроорганизмах и их полезных и вредных свойствах.

Прошло столетие, и разнообразные микроорганизмы – мицелиальные грибы, дрожжи, бактерии – стали интенсивно использоваться в новой отрасли – микробиологической промышленности. В СССР в середине 30-х годов были построены заводы по производству кормовых дрожжей на гидролизатах древесины, сельскохозяйственных отходах и сульфитных щелоках. В эти же годы создавались микробиологические производства по получению глицерина, витаминов, ацетона и бутанола. Можно считать, что такое активное развитие предшественницы биотехнологии – микробиологической промышленности – сыграло свою положительную роль во время Великой Отечественной войны.

В этот период под руководством академика В.Н. Шапошникова в г. Грозном в течение нескольких месяцев был простроен микробиологический завод по производству ацетона и бутанола с использованием ацетоно-бутиловых бактерий. В основе производства лежала сформулированная В.Н. Шапошниковым идея о двухфазности процессов брожений, которая стала в последствие основной теорией, на которой основаны многие биотехнологические производства. В то военное время наличие достаточных количеств этих растворителей, как тогда писали, способствовало нашей победе в Великой Отечественной войне.

Во время второй мировой войны начался новый период в развитии биотехнологии – производство антибиотиков. В этот период особенно возросла роль мицелиальных грибов как промышленных продуцентов. Создание биотехнологии получения этих медицинских препаратов способствовало не только углублению теории двухфазности В.Н. Шапошникова и детальному изучению теории и практики микробных синтетических процессов, но и привело к созданию нового биотехнологического оборудования – ферментеров, фильтров для отделения биомассы, качалок и др.

Период 1950–60 гг. в СССР характеризуется созданием мощной промышленности антибиотиков, организацией активно развивающейся микробиологической промышленности и созданием академических и прикладных институтов с биотехнологической направленностью. Большое значение в те годы для развития биотехнологии в нашей стране имели создание в 1963 г. Всесоюзного

научно-исследовательского института биосинтеза белковых веществ (ВНИИСинтезбелок) из биомассы микроорганизмов, Института генетики и селекции микроорганизмов, выделение в 1966 г. микробиологической промышленности в отдельную отрасль – Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР (Главмикробиопром). В этот период начинает активно развиваться микология, курируемая акад. Л.И. Курсановым и чл.-корр. М.В. Горленко.

Генно-инженерные методы советские ученые начали активно разрабатывать с начала 70-х годов. В основе этих исследований лежали следующие мировые открытия 60-х годов: обнаружение экстрахромосомных элементов ДНК (плазмид), которые в дальнейшем стали широко использоваться в генной инженерии, открытие смыслового значения триплета нуклеотидов для кодирования генетической информации, описание мРНК, обеспечивающей связь между процессами, происходящими в ядре, и белковым синтезом в цитоплазме. В начале 70-х годов в СССР под руководством академика Ю.А. Овчинникова был успешно осуществлен проект «Ревертаза», и была получена в промышленных масштабах обратная транскриптаза.

70–80-е годы XX века можно считать годами интенсивного развития и становления биотехнологии. В специальном проекте «Основные направления экономического и социального развития СССР на 1986–1990 годы и на период до 2000 года» планировалось активно внедрять научно-технические достижения в области биотехнологии и генной инженерии, при этом за эту пятилетку выпуск в СССР биотехнологической продукции должен был быть увеличен в 2 раза. К концу 70-х годов отечественными биотехнологами был успешно освоен комплексный подход к созданию производственных штаммов – одновременное использование методов эволюционной и метаболической инженерии. Такими методами в начале 80-х годов в СССР были получены продуценты треонина на базе *E. coli*, заменившие коринебактерии, и витамина B₂ – рибофлавина – с использованием генно-инженерного штамма *Bacillus subtilis* вместо специально отселекционированных дрожжей (работы чл.-корр. В.Г. Дебабова с сотр.). Получение таких генно-инженерных штаммов в конце

70-х годов в СССР справедливо рассматривается как революционное событие, и некоторыми учеными наряду с проектом «Реввертаза» приравнивается к началу становления биотехнологии в нашей стране.

К концу 80-х годов в СССР был создан научный и технологический потенциал и, как отмечалось выше, планировалось интенсификация развития биотехнологических производств, причем в эти годы активно начали использоваться как продуценты мицелиальные грибы. В Ленинграде успешно развивались исследования по получению искусственно созданных штаммов – суперпродуцентов лимонной, фумаровой, яблочной и других кислот из мицелиальных грибов и дрожжей.

Особое внимание уделялось разработке методов глубинного культивирования базидиальных грибов. Функционировали три завода по производству β -каротина с использованием штамма мицелиального гриба *Blakeslea trispora* (в Краснодаре, Свердловске и Верхнеднепровске), и одновременно, совместно с заводом «Уралбиофарм», начались работы по получению генно-инженерного штамма – продуцента каротина на базе *E. coli*. Был также утвержден проект по получению из мицелиальных грибов и дрожжей липидов – заменителей растительных масел – в первую очередь, подсолнечного, получение биотехнологическим способом из мицелиальных грибов полиненасыщенных жирных кислот – линолевой, линоленовой, арахидоновой, и другие проекты, в том числе, по получению и других лекарственных препаратов.

Однако к концу 80-х гг. началась эпоха перемен, биотехнологические производства, в первую очередь, микробиологические, стали нерентабельными, начался отток наиболее ценных кадров за рубеж, новые разработки не получили развития в России, и практически развитие биотехнологии в России было приостановлено. Более того, не была составлена целевая программа развития биотехнологии, а в проект федерального закона «О федеральном бюджете на 2001 год» она просто не была включена. Но уже к концу 2000 г. отношение правительственных чиновников к биотехнологии начинает меняться. 16 ноября 2000 г. по инициативе Комитета Государственной думы по про-

мышленности, строительству и наукоемким технологиям были проведены парламентские слушания «О перспективах развития российской биотехнологии» с привлечением известных ученых России. Большое значение имели выступления акад. А.С. Спирина и К.Г. Скрябина. В целом, в результате парламентских слушаний 2000 г. был сделан вывод – без правительственной инициативы, государственной инновационной программы Россия не сможет в XXI веке стать полноправным участником мирового биологического рынка.

В настоящее время катастрофическое положение с биотехнологией в России начинает, правда достаточно медленно, исправляться. Начинает работать программа финансовой поддержки ученых, все большее внимание начинает уделяться экологической безопасности биотехнологических производств. В 2005 г. в Госдуме было принято решение о поддержке Программы развития биотехнологии в России, которая ранее была принята на съезде Общества биотехнологов им. Ю.А. Овчинникова в России.

Большое значение для развития биотехнологии в РФ должно оказать принятие и выполнение «Комплексной программы развития биотехнологии РФ на период до 2020 г». Цель программы – выход России на лидирующие позиции в области биотехнологии, в том числе по отдельным направлениям, среди которых биомедицина занимает лидирующую позицию. Ожидаемые результаты реализации программы – увеличение в 8,3 раза объема потребляемой биотехнологической продукции.

Примечательным для современного этапа развития биотехнологии в России является особое внимание, которое начинает уделяться физиологии и биохимии используемых продуцентов, а также особый интерес к грибам. Современное человечество начинает понимать, что это особая группа эукариотных организмов, в определенных отношениях достаточно близкая к нам, обладает мощными механизмами биохимической адаптации и апикальным ростом и способна выдерживать экстремальные условия существования.

Грибы легко адаптировать к заводским условиям, они быстро и на относительно дешевых субстратах накапливают большую биомассу, в производстве можно получать до 10 целевых про-

дуктов, что повышает его рентабельность и делает экологически более чистым.

Наконец, следует особо отметить все возрастающий интерес к грибам, как источникам получения лекарственных препаратов, в большинстве случаев, не имеющих побочных вредных эффектов. Само использование грибов в пищу, по мнению японских и китайских врачей, обеспечивает долголетие. В последние годы появились новые отрасли применения грибов, кроме пищевой индустрии – это антиоксиданты и «успокаивающие» вытяжки из плодовых тел грибов, обеспечивающие натуральный сон с переходом в активное бодрствование.

Литература

- Баев А.А. Новые направления в биотехнологии // Биотехнология. 1985. № 7. С. 8–17.
- Безбородов А.М., Загустина Н.А., Попов В.О. Ферментативные процессы в биотехнологии. М.: Наука, 2008. 335 с.
- Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И. Микробиологический синтез. СПб.: Проспект науки, 2011. 144 с.
- Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология. Проблемы и перспективы. М.: Высшая школа, 1987. 159 с.
- Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. Учебное пособие для студентов. М.: Мир, 2006. 504 с.
- Луценко Н.Г. Начала биотехнологии. М.: МАИК «Наука/Интерперидика», 2002. 125 с.
- Самуилов В.Д., Олескин А.В. Технологическая биоэнергетика. М.: Изд-во МГУ, 1994. 192 с.
- Теоретические основы биотехнологии. Под ред. И.М. Грачевой. М.: Книжный дом, 2003. 213 с.
- Шапошников В.Н. Техническая микробиология. М.: Советская наука, 1948. 411 с.
- Шапошников В.Н. Физиология обмена веществ микроорганизмов в связи с эволюцией функций. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 161 с.
- Шапошников В.Н. Основные физико-химические закономерности физиологии обмена веществ микроорганизмов. М.: Наука, 1968. 123 с.

Глава 2

Инновации в биотехнологии грибных производств, основанные на новых представлениях об онтогенезе грибов и составе их клеточной стенки

2.1. Инновации в подготовке спорового посевного материала

В последние годы появились новые направления в биологии и биотехнологии, которые обязаны своим возникновением фундаментальным достижениям в области микологии. Так, значительный прогресс в изучении химического состава клеток грибов и их субклеточных фракций на различных стадиях онтогенеза позволили создать прогрессивные биотехнологии, среди которых выделилось целое направление – использование грибов в медицине, приобретающее все большее значение в лекарственной индустрии. Конкретизируя, можно сказать, что особенно плодотворными для получения лекарственных препаратов из грибов оказались два направления исследований: в области спорогенеза грибов и изучения химического состава их клеток и клеточных стенок (КС).

В настоящее время биотехнология грибных производств имеет в качестве основной составляющей подготовку активного спорового посевного материала и разработку способов его сохранения для проведения целевых ферментаций. В современных опытно-промышленных регламентах (ОПР) все чаще включаются: определение типа покоя спор, скорость их прорастания, установление соединений и физико-химических факторов, ускоряющих выход покоящихся клеток из онтогенетического

анабиоза, стандартизация спорового посевного материала и разработка способов его сохранения в активном состоянии.

В основе этих разработок лежат современные представления о спорогенезе грибов, как ответной реакции на стрессовые воздействия, роли в этом процессе протекторных соединений, новые представления об апикальном росте и роли клеточной стенки в процессе прорастания спор. Используя новые представления о состоянии покоя, в современной биотехнологии стали применять несколько приемов, способствующих увеличению выхода спорового посевного материала. В основе одного из них лежат данные фотобиологии, показавшие, что свет и длина его волны могут существенно стимулировать процесс спорогенеза.

В бесполом цикле развития грибов различают три стадии цитодифференцировки: 1-я стадия – прорастание споры и последующее образование мицелия, 2-я стадия – образование спорофоров, 3-я стадия – образование спорангиев. При изучении действия света на процесс спорообразования различают две основные фазы: индуктивную (образование спорофор) и терминальную (образование конидий или спорангиоспор).

Наибольший интерес представляют данные по влиянию света различного спектрального состава на ряд грибов-патогенов. Было установлено, что действие светового стимула, полученного в индуктивную фазу, передается в терминальную. В дальнейшем было показано, что воздействие светом определенной длины волны на процесс спорообразования вызывает изменения в химическом составе спор (липидном и углеводном), что приводит к изменению метаболизма выросшего из таких спор мицелия и усилению спорогенеза.

Например, мицелий *Aspergillus japonicus*, выращенный из спор, образование которых происходило под воздействием зеленого света ($\lambda = 530$ нм, $I = 2,05$ Вт/м²), имеет более высокие целлюлогидролазную и эндоглюканиазную активности по сравнению с контролем, а зеленый свет в 3–4 раза стимулирует процесс спорообразования. Эти данные открыли новые возможности для биотехнологии: соответствующие воздействия на посевной материал (получившие впоследствии название «Züchtung» – воспитание спор), обеспечили не только увели-

чение выхода посевных спор, но и дали возможность увеличить выход конечного продукта. В последствии этот метод (предварительное облучение посевных спор зеленым светом) позволил в 3–5 раз увеличить уровень β -каротина в мицелии *Blakeslea trispora* и повлиять на процесс получения фузикококцина у *Fusicoccum amygdaly*. При производстве лечебного препарата «Миколикопин» (активное начало – ликопин грибов) получать активный посевной материал можно также, используя действие зеленого света с длиной волны 530 нм ($I = 1,7 \text{ кВт/м}^2$) на процесс спорогенеза. При таком освещении в терминальной стадии спорогенеза у гетероталличных штаммов гриба-продуцента *Blakeslea trispora* образуются споры, содержащие больше липидов и обогащенные фосфатидилхолином, который способствует более длительному сохранению активного спорового материала. В то же время, использование зеленого света в процессе спорогенеза позволяет в значительной степени (в 2 раза) увеличить выход спор, используемых в качестве посевного материала при биотехнологическом процессе получения ликопина.

Большое значение для сохранения всхожести посевного материала имели данные о роли трегалозы. К концу XX века было установлено, что при прорастании споры происходит процесс разложения трегалозы под действием фермента трегалазы с образованием глюкозы. До сих пор остается неясным, почему эта образовавшаяся из трегалозы глюкоза практически не используется прорастающей спорой, а превращается в фосфорилированные триозы, причем окончательным этапом этого процесса является образование глицерина. Однако трегалоза используется спорами, находящимися в состоянии покоя, так как в покое, по современным данным, все же сохраняется определенный уровень метаболизма.

В настоящее время установлено, что имеются существенные различия в липидном и углеводном составах спор, которые могут долго храниться (ДХ) или быстро теряют всхожесть (ТВ). На примере мукоровых и аскомицетных грибов было показано, что уровень трегалозы в хранящихся спорах должен быть не менее 3–5%, и снижение всхожести четко коррелирует с увеличением в спорах уровня углеводов и с появлением в составе

углеводов конидий низкомолекулярных полиолов и глюкозы. Другими словами, у ТВ-спор увеличивается содержание арабита и уменьшается уровень маннита и трегалозы, а в составе липидов начинает преобладать фосфатидилэтаноламин и резко снижается содержание фосфатидилхолина. В то же время у ДХ-спор преобладает трегалоза, а в составе фосфолипидов – фосфатидилхолин. Методом ЭПР на примере конидий *Aspergillus japonicus* показано, что трегалоза предохраняет мембраны спор при дегидратации, что обеспечивает их жизнеспособность. Поэтому в современных биотехнологических разработках для сохранения активного посевного материала используются споры, выращенные на среде с добавлением трегалозы, что позволяет лучше сохранять состояние покоя и всхожесть спор.

В биотехнологии грибных производств значительное внимание уделяется также активации прорастания посевных спор, что связано с сокращением сроков ферментации и удешевлением стоимости конечного продукта. В связи с этим в последние годы наблюдается определенный прогресс в знаниях о прорастании покоящихся клеток и механизмах, контролирующих состояние покоя. Было установлено, что у спор *Bacillus subtilis* этот процесс тесно связан с образованием клеточной стенки (КС), и его регуляторами являются муропептиды.

У грибов образование конидий зависит от ассоциированных с КС специальных белков, которые передают сигнал внутрь клетки и контролируют состояние покоя и «пробуждения» споры. Возможно, существует некоторая аналогия между β -глюканом КС грибов и пептидогликанмуропептидами бактерий, при этом глюкан может служить сигналом, запрещающим или разрешающим прорастание грибных спор. В связи с этим предположением представляет интерес наблюдение, что муропептиды, полученные из бактерий, способствуют росту гиф *Candida albicans*. Это позволяет допустить, что эти молекулы служат интер-сигналом всех «низших» организмов.

В настоящее время в биотехнологии применяется несколько приемов, позволяющих ускорить выход спор из состояния покоя. Это – использование стимуляторов прорастания, например, добавки к ферментационной среде D-глюкозамина или N-ацетил-

D-глюкозамина. Эти соединения, которые входят в состав биополимера хитина, способствуют не только ускорению процесса прорастания, но и синхронному выходу спор из состояния покоя.

В биотехнологии часто пользуются еще одним приемом, который получил название «пробуждение спящих спор». С этой целью устанавливают соединения, которые ускоряют прорастание спор, это могут быть некоторые аминокислоты, моносахариды и, особенно, цАМФ. Собранные споры перед внесением в ферментационную среду культивируют в течение 30–60 минут в присутствии соединений-стимуляторов, под влиянием которых образуются «наклюнувшиеся» споры, которые далее вносят в ферментер. Этот прием обеспечивает сокращение на 4–6 часов времени ферментации для получения конечного продукта. Данные по изучению химического состава спор грибов аскомицетного аффинитета позволили также установить, что прорастание спор связано не только с изменениями в углеводном и фосфолипидном составе, но и с резким повышением уровня гиббереллинов (свободных и связанных), а также с увеличением уровня нейтральных липидов, в частности, эфиров стериннов, что в какой-то степени напоминает процессы, происходящие у растений. Поэтому предварительная краткосрочная обработка спор гиббереллинами перед посевом обеспечивает более быстрое и синхронное прорастание посевного материала в условиях ферментера.

Покоящиеся споры имеют еще один биохимический механизм, способный контролировать состояние покоя. Это специальные соединения, называемые самоингибиторами или аутоингибиторами прорастания. Наиболее подробно изучен и синтезирован ингибитор прорастания спор *Colletotrichum gloesporioides*, названный глоеспороном. Состояние покоя и прорастание конидий у *Penicillium paneum* регулируется летучим самоингибитором 1-октен-3-олом. Этот ингибитор является продуктом ферментативного разрушения линолевой кислоты липооксигеназой и гидропероксиделиазой. Запах грибов, особенно свежесобранных и слегка поврежденных, связан с биосинтезом 1-октен-3-ола. У агриковых грибов запах сильно ощущается в мякоти шляпки, где образуются споры. Этот за-

пах наиболее характерен для плодовых тел *Agaricus bisporus* с величиной шляпки 35 см и закрытым покрывалом. 1-Октен-3-ол выделяется в воздушную среду в очень высоких концентрациях в то время, когда образуются пропагулы, как у пенициллов, так и у агариковых грибов, у которых это соединение выполняет функцию ингибитора прорастания. Кроме того, 1-октен-3-ол может выполнять роль «драйвера» в образовании спор и их распространении в воздухе.

Совместно с 1-октен-3-олом у грибов может происходить синтез другого метаболита – 10-оксо-транс-8-деценной кислоты. Полагают, что этот ауторегулятор работает в тандеме с 1-октен-3-олом и участвует также в регуляции ростовых процессов – регулирует рост мицелия и инициацию плодовых тел. Эти данные позволяют предположить, что продукты ферментативного разрушения линолевой кислоты могут иметь большое значение в транзиции образования у грибов сексуальных и вегетативных структур при нарушении состояния покоя.

У ржавчинных грибов имеются свои специфические аутоингибиторы прорастания – метиловый эфир цис-феруловой кислоты и метиловый эфир 3,4-диметоксикоричной кислоты. Основная функция этих соединений та же, что и у вышеуказанных аутоингибиторов – подавление процесса прорастания спор после их образования и при переносе их с воздушными потоками. Поэтому у грибов синтезируется обычно два типа ауторегуляторов – летучие и нелетучие соединения.

Следует отметить еще один фактор, регулирующий состояние покоя – это концентрация спор в среде. Скопление в среде большого количества спор приводит к угнетению их прорастания из-за наличия самоингибиторов, накапливающихся в очень высокой концентрации. В этом случае достаточно промыть споры в воде, и можно наблюдать их интенсивное прорастание.

В сохранении состояния покоя, вероятно, большое значение имеет КС грибов, в частности ее химический состав. Как отмечалось выше, в КС грибов удивительным образом собраны соединения, защищающие спору от литических ферментов, ядов, высокой температуры и других стрессовых воздействий (аминополисахариды, глюканы, белки, липиды, спорополленин,

мукоран и др.). Интересно, что соединения, входящие в состав КС, могут влиять и на интенсивность спорогенеза. Так, для гриба – патогена беспозвоночных *Beauveria bassiana* – добавление хитозана к среде выращивания приводит к интенсификации спорообразования. Основным фактором, сохраняющим состояние покоя, является регуляция проницаемости клеточной стенки споры, в первую очередь, для воды. О том, что изменение проницаемости клеточной стенки, вызванное, например, изменением осмотического давления (обработка глицерином) приводит при наблюдении в микроскоп к «просветлению» КС, было известно еще в 80-е годы прошлого столетия при изучении активации спор *Phycomyces blakesleeanus*. Данные последних лет показали, что изменение проницаемости связано с фазовым состоянием липидного бислоя.

Таким образом, в настоящее время, благодаря теоретическим разработкам в области микологии, мы можем управлять основной частью биотехнологического процесса получения БАВ из грибов, а именно иметь активный споровый материал и регулировать процесс его прорастания.

2.2. Феномен апикального роста грибов и его значение для биотехнологии. Перспективы практического использования хитина грибов

Благодаря апикальному росту (гриф растет своим кончиком со скоростью до 100 мкм в минуту) грибы способны накапливать рекордно большие количества биомассы. Эта способность мицелиальных грибов чрезвычайно важна для биотехнологических производств. В среднем, выход биомассы на хорошо сбалансированной по источникам углерода и азота среде может достигать более 40 г сухого мицелия на 1 л среды. Уникальная способность грибов к быстрому росту требует поддержания высокой активности специальных образований – активных филаментов и микротрубочек, а также интенсивных биосинтетических процессов и высокой активности механизмов вторичного транспорта субстратов. Кроме того, интенсивный рост и морфология КС зависит от ее химического состава.

КС грибов состоит из структурных полимеров и матрикса. Для современной биотехнологии (см. Часть 2, разд. 2.1) наибольший интерес представляет структурная часть КС, состоящая из полисахаридов: хитин, $\beta(1-3)$ - $\beta(1-6)$ глюканы, $\beta(1-4)$ -глюкан (целлюлоза). Последняя входит в состав КС псевдогрибов. Особое внимание в медицине и в промышленности уделяется сейчас хитину и его деацетилированному производному – хитозану.

Интерес к хитину и, особенно, хитозану постоянно растет, что объясняется их уникальными свойствами, позволяющими использовать эти полиаминосахариды в различных областях промышленности, в медицине и сельском хозяйстве. Основным источником получения хитина до сих пор является панцирьсодержащее сырье (ПСС), получаемое как отход от производств, в которых используют представителей Arthropoda. Мировых запасов ПСС хватит для получения 150 тыс. т хитина в год.

Однако, несмотря на то, что в последние годы запасы ракообразных увеличиваются за счет их искусственного разведения, все острее встает вопрос о новых источниках получения хитина. Ими могут быть некоторые водоросли, в частности *Thalassiosira fluviatilis* и *Cyclotella cryptica*, насекомые, гидробионты (например гидроид *Obelia longissima*, моллюск фараонова каракатица) и грибы. Из диатомовых водорослей получают высококристаллические хитиновые волокна, выход которых составляет 76–80%. Однако все попытки культивировать эти водоросли в искусственных условиях в виде периодических культур или путем проточного культивирования не являются экономически выгодными, так как выход биомассы водорослей оказывается незначительным.

В этом отношении более перспективны гидроиды *Obelia longissima*, которые легко культивируются в условиях моря. В настоящее время разработан и запатентован способ получения хитина и хитозана из биомассы этих гидроидов. Источники получения хитина могут быть и более экзотическими: предложено получать хитин из надкрыльев тараканов, майских жуков, кораллов и термитов. Но, к сожалению, все эти методы получения аминопалисахаридов не пошли далее уровня кустарного производства. Учитывая достаточно низкую предполагаемую

стоимость хитина, получаемого из грибов, именно этот источник должен стать одним из основных в биотехнологии XXI в.

В настоящее время не вызывает сомнений, что именно мицелиальные грибы, относящиеся к порядку Eurotiales и Mucorales, представляют наибольший интерес для биотехнологов как продуценты аминополисахаридов. Объясняется это следующими причинами. Как отмечалось выше, из всех известных организмов, образующих хитин, грибы обладают самой высокой скоростью роста. Получение грибной биомассы происходит в ферментерах и не зависит от сезонности и капризов погоды. Содержание хитина в грибах достаточно высокое – до 60% от веса клеточной стенки. Для выращивания грибной биомассы в качестве питательных сред можно использовать самые дешевые субстраты – жидкие отходы целлюлозно-бумажной промышленности (сульфитные щелока), годовой объем которых превышает сотни миллионов тонн в год, а также крахмалсодержащие отходы пищевой промышленности, отходы от молочных производств, например, сыворотку и другие отходы.

Производство грибного хитина имеет ряд технологических преимуществ по сравнению с производством хитина крабов. Например, отпадает необходимость в размельчении получаемого конечного продукта, удаления из него карбоната кальция. Производство становится экологически более чистым, так как при получении грибного хитина применяются разбавленные кислоты и щелочи, не требуется создания больших отстойников для агрессивных жидкостей.

Однако хитин мицелиальных грибов отличается от хитина других биологических объектов по своим физико-химическим свойствам. У всех исследованных грибов хитин содержит меньше азота, чем хитин Arthropoda.

Хитины, полученные из грибов и других природных источников, отличаются также и по степени кристалличности. Наиболее высококристаллической формой является хитин Arthropoda (краба *S. magister* и криля) и гидроидов. Сравнение хитинов грибов показывает, что хитин плодовых тел *A. bisporus* имеет более кристаллическую форму, а хитин мукоровых грибов имеет наименее упорядоченную структуру и большее число аморфных

областей. Отличие хитина грибов от хитинов, полученных из других природных источников, проявляется и в составе его мономеров. Как отмечалось выше, из аскомицетных и базидиомицетных грибов получают трудноразделимый комплекс кислото- и щелоченерастворимых глюканов и хитина. Поэтому при кислотном гидролизе этого комплекса образуется не только глюкозамин, но и глюкоза. Хитин низших грибов порядка *Mucorales* при жестком кислотном гидролизе деполимеризуется только до глюкозамина. Однако в гребешке *Sepia*, а также у *Scrupocellaria berthelotti* конечным продуктом гидролиза являются галактозамин и рамнозамин, т.е. и по составу мономеров имеются отличия в природных образцах хитина.

Хитины грибов различаются по степени деацетилирования (СД). Наибольшее число ацетильных групп имеет хитин *Arthropoda*, хитин-глюкановый комплекс аскомицетных грибов менее ацетилирован из-за наличия глюканов. Среди мукоровых грибов более высоким содержанием ацетильных групп отличается хитин *Cunninghamella japonica*, а также *Absidia coerulea*, хитин насекомых, в частности рыжего таракана *Blattella orientalis*, ацетилирован более сильно, но меньше, чем хитин крабов.

Отличия в физических свойствах природных хитинов различного происхождения выявляются также при изучении их ИК-спектров. Характеристические полосы для хитина в ИК-спектре лежат в областях 3265, 3105, 1655–1620 (амид I) и 1550 см⁻¹ (амид II). Наиболее заметные отличия хитинов проявляются в области 1000–1100 см⁻¹ и в соотношении пиков амид I и амид II.

Установлено также, что хитин грибов не только отличается от хитина крабов, насекомых и водорослей, но и достаточно специфичен для определенного вида грибов. Особенно заметные различия отмечаются в физико-химических свойствах хитинов агариковых и мукоровых грибов.

Полученные данные представляют интерес с практических позиций, учитывая установленные корреляции между кристалличностью хитина и его сорбирующей способностью. Как правило, хитин грибов лучше сорбирует ионы тяжелых и радиоактивных металлов, причем на активность сорбционных процессов большое влияние оказывает наличие в КС грибов глю-

кана и хитозана. Показано также, что сорбционная способность клеток грибов меняется в зависимости от стадий морфогенеза и зависит от возраста погруженно растущего мицелия.

Таким образом, хитин краба существенно отличается от хитина грибов по следующим признакам: молекулярной массе, степени деацетилирования, ИК-спектрам, элементному составу. Более того, даже у грибов, относящихся к различным систематическим группам, можно обнаружить различия в физико-химических свойствах этого биополимера. Так, хитин мукоровых грибов отличается по ряду физико-химических свойств от хитина базидиомицетов, например, по способности сорбировать ионы некоторых тяжелых металлов, а также по элементному составу. Хитин крабов *Cancer magister* содержит азота – 6,37%, углерода – 43,74%, водорода – 6,87%, а хитин грибов, например *Aspergillus niger*, – 4,99, 43,77, 6,44% соответственно. Интересно, что хитин диатомовых водорослей, в отличие от грибного, является не γ -, а α -хитином и имеет высокую степень кристалличности, за что получил название хитана.

Изложенные выше данные интересны с двух точек зрения. Во-первых, наблюдается определенная корреляция между степенью кристалличности и величиной биологического объекта, из которого получен этот биополимер. Среди исследованных в этом направлении грибов макроформой являются базидиомы *Agaricus bisporus*, хитин которого имеет наиболее высокую степень кристалличности. Такую же закономерность – наличие более упорядоченной структуры хитина в зависимости от размеров объекта можно заметить и для хитина ракообразных, в частности, при сравнении хитина крыля и крабов. Во-вторых, вероятно, что степень кристалличности хитина связана и с составом клеточной стенки (КС).

Наиболее высокой эта величина является у высших грибов, а именно, у тех, которые содержат хитин-глюкановый комплекс. Грибы, в КС которых содержится хитин-хитозан, имеют менее выраженную степень кристалличности, и возможно, в этом случае хитин выполняет не только опорную функцию в комплексе с глюканом, но и координирует контроль электрохимических процессов и участие в транспорте полианионов. Различия в физико-химических свойствах хитинов, полученных из разных природных источников, включают

также различную способность сорбировать воду и устойчивость к термическому воздействию.

Практическое использование хитина в медицине оказалось тесно связанным с изложенными выше физико-химическими свойствами этого биополимера и, в частности, существенно зависит от источника его получения (см. ниже Часть 3).

Литература

- Морозова Е.В., Козлов В.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. Изменения в липидном и углеводном составе конидий *Aspergillus niger* в процессе прорастания // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 2. С. 149–154.
- Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 722–733.
- Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алехин А.И., Сергеева Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология 2012. Т. 42. № 1. С. 3–17.
- Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.
- Bowman S.M., Free S.J. The structure and synthesis of fungal cell wall // BioEssays. 2006. V. 28. P. 779–808.
- Muzzarelli R.A. Chitin. Oxford–Toronto–Paris–Frankfurt–New York: Pergamon Press, 1978. 309 p.

Часть 3
Основные направления в изучении
биологически активных веществ
грибов в современной медицине
и других областях

Глава 1

Питательная ценность съедобных грибов

1.1. Питательная ценность наиболее перспективных съедобных грибов

XXI век поставил перед человечеством новую задачу – рациональное питание населения с введением в рацион соединений, имеющих не только питательную ценность, но и способность защитить организм от стрессовых ситуаций, сезонных колебаний погоды, смены временных поясов, ионизирующего излучения, инфекционных заболеваний и загрязненной окружающей среды. Однако проблема «правильного» питания осложняется тем, что, по данным ФАО ООН, более половины населения планеты не обеспечено достаточным количеством пищевых продуктов: примерно 500 млн людей голодают, около 2 миллиардов питаются неправильно.

В последнее время особенно остро ощущается дефицит белка (например, ежегодный дефицит составил к 2000 г. около 18 млн. тонн в год). Особенно заметен в последнее время дефицит белка в пище в РФ; по данным последнего медицинского обследования, при недостатке белка наблюдается неправильный рост костной ткани, особенно заметный среди подрастающего поколения.

Как показывают последние данные ФАО ООН, решить эту проблему можно, значительно расширив новые источники питания, среди которых наряду с морепродуктами основное место будет принадлежать грибам. Подсчитано, что примерная оценка выхода говядины при ее производстве современными методами составляет 63,5 кг сухого белка на 1 га в год; многие грибоводческие предприятия уже в настоящее время получают в год 67–78 тонн сухого белка с 1 га обрабатываемой площади.

Но грибы представляют интерес не только как заменители пищевого белка. Сейчас эти низшие эукариоты ценятся как природные источники витаминов, микроэлементов, антиоксидантов, липидов, ростстимулирующих соединений и других биологически активных веществ (БАВ) (см. ниже). По содержанию в грибах этих природных соединений можно составлять оптимальные лечебные диеты.

Промышленное производство съедобных грибов во многих странах мира выделилось в самостоятельную высокопроизводительную отрасль – грибоводство. Объем производства грибов в мире уже в 1986 г. достигал 1,2 млн тонн, в настоящее время эта цифра возросла в среднем в 3 – 4 раза. Ранее большую часть (до 72% продукции культивируемых грибов) составляли виды рода *Agaricus*: шампиньон двуспоровый – *Agaricus bisporus* и шампиньон двукольцовый – *Agaricus bitorquis*. Перечень наиболее широко культивируемых в мире видов включает также шиитаке (большее распространение получило название шиитаке) – *Lentinus edodes*, зимний опенок – *Flammulina velutipes*, вольвариеллу вольвовую – *Volvariella volvacea* и виды рода *Pleurotus*.

В настоящее время в этой группе грибов следует присоединить навозник белый – *Coprinus comatus*, трюфель черный – *Tuber melanosporum*, трутовик японский – *Ganoderma japonicus*, пилолистник тигровый – *Panus tigrinus*. Согласно материалам XXIV конгресса «Исследование и культивирование съедобных грибов», в начале XXI в. особое внимание будет уделено относительно редко культивируемым грибам (сморчкам и трюфелям).

Последнее десятилетие проблемы выращивания грибов рода вешенка (*Pleurotus*) привлекают особое внимание ученых-микологов многих стран. Результатом определенных успехов, достигнутых в селекции новых штаммов и совершенствовании технологии культивирования этих видов, явилось то, что уже в 1985 г. по объему вешенка заняла 2-е место в Европе после шампиньонов и 3-е место в мире после шиитаке. В настоящее время в Европе основное внимание начинают уделять вешенке, а на Востоке по-прежнему лидирует шиитаке. Мировое производство свежих грибов вешенки обыкновенной уже в 1986 г. составило около 40 тыс. тонн.

Самым крупным производителем является Италия, где ежегодно производство вешенки достигает 10 тыс. тонн. В Венгрии производится 3 тыс. тонн, в Германии – 2 тыс. тонн, во Франции – 1 тыс. тонн, в Бельгии – 100 тонн, в Нидерландах – 300 тонн. В 1999 г. мировое производство грибов составило около 6 млн. тонн в год, в 2001 г. – эта цифра достигла 10 млн. тонн в год, главным образом, за счет интенсификации грибоводства в Японии, Италии, Франции и, особенно, в Китае. Последние страны планировали в несколько раз увеличить вклад грибов в питание людей в этом году.

Преимуществами грибов *Pleurotus* перед другими культивируемыми грибами являются: высокая скорость роста мицелия и значительная конкурентоспособность по отношению к посторонней микрофлоре; способность утилизировать разнообразные растительные отходы сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности (ряд углеродсодержащих соединений, в том числе такие труднодоступные, как целлюлоза и лигнин); относительная простота технологии выращивания, исключая длительный процесс подготовки субстрата и необходимость покровной почвы для культивирования всех видов рода вешенка, кроме *P. cystodiosus*; возможность использования субстрата после сбора грибов в качестве удобрения или для корма сельскохозяйственных животных; устойчивость к бактериальным, грибным и вирусным болезням; способность без ухудшения внешнего вида и качества переносить длительное хранение и транспортировку; высокие вкусовые и питательные свойства плодовых тел, приятный запах, простота кулинарной обработки.

В процессе культивирования грибов рода вешенка можно решить не только вопрос получения пищевого продукта в виде плодовых тел, но и также такие актуальные проблемы XXI века, как интенсификация производства путем наиболее полного использования сырья, удаление целлюлозо-лигнинсодержащих отходов сельского хозяйства и промышленности, а также получение новых лекарственных препаратов.

К высшим базидиомицетам относится около 10000 видов из 550 родов и 80 семейств. Из этих грибов в настоящее вре-

мя известно около 200 видов, обладающих ярко выраженным действием на раковые клетки. Поэтому все большее значение приобретает идея о том, что шляпочные грибы могут служить не только продуктами питания, но и ценными лекарственными средствами. Следует отметить, что такой взгляд на грибы исходит из глубокой древности. Так в «Перечне лекарственных средств Божественного Святителя» восточной династии Хань в Китае следующие грибы рассматриваются как лекарственные препараты: *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis*, *L. edodes* и др.

В России основной грибоводческой культурой наряду с шампиньонами является вешенка. По прогнозам «конкурентом» этим грибам может стать гриб сиитаке *L. edodes*. Этому способствуют ценные медицинские свойства сиитаке, подтвержденные наблюдениями о том, что японцы и китайцы имеют самый низкий в мире уровень заболеваний раком и диабетом. И именно эти народы практически ежедневно употребляют в пищу *L. edodes*. В медицинском отношении вешенка менее изучена, однако есть данные о получении из культуральной жидкости этого гриба и противовирусных БАВ, в частности против вируса иммунодефицита.

Перед изложением данных о медицинском значении съедобных грибов, мы считали целесообразным привести результаты исследований об их питательной ценности, и в этом плане наиболее изученными оказались перечисленные выше грибы – вешенка и сиитаке. Химический состав съедобных грибов интенсивно изучался в 90-е годы прошлого столетия украинскими учеными, а также зарубежными микологами, например Kennet Jones (1995). Широко проводилось определение состава липидов и полисахаридов вешенки и шампиньона в конце 90-х годов в Институте микробиологии РАН. Большой вклад в развитие исследований по культивированию съедобных грибов внесен проф. Л.В. Гарибовой (Биологический факультет МГУ).

1.1.1. Химический состав и питательная ценность плодовых тел вешенки

Общее название – *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm – вешенка обыкновенная, устричная.

Синонимы: устричный гриб (*Oyster shelf*, *Tree oyster*), *Hiratake*, *Tamogitake* (японские названия). Наиболее близкий вид – *Pleurotus pulmonarius*.

Цикл созревания урожая – 3–4 в год.

Развитие примордиев. Температура инкубации – 50–60°F (10–15°C); относительная влажность – 95–100%; продолжительность – 3–5 дней; CO₂ – менее 1000 ppm; потребность в освещении – 1000–2000 люкс.

Образование плодовых тел. Температура инкубации – 60–70°F (15–21°C); относительная влажность – 85–90%; продолжительность – 4–7 дней; CO₂ – менее 1000 ppm; потребность в освещении – 1000–2000 люкс.

По питательной ценности, определяемой как отношение суммы незаменимых аминокислот в яичном белке, плодовые тела вешенки обыкновенной находятся на уровне картофеля и бобовых. При этом интересно, что по этим показателям *P. sajor-caju* значительно больше отвечает требованиям стандартного белка ФАО, чем аминокислотный состав белка *P. ostreatus*. Лимитирующей аминокислотой для этого вида вешенки является лизин (Табл. 1 и Табл. 2). По содержанию «сырого протеина» *P. ostreatus* также несколько уступает *P. sajor-caju* (30–41,6 и 26,6–47,4 % соответственно).

Содержание «сырого протеина» в шляпке грибов в 2 раза выше, чем в ножке, однако уровень его очень сильно варьирует не только у разных штаммов вешенки, но и в зависимости от состава субстрата для выращивания. Усвояемый белок вешенки составляет 89,9 – 92,2%. Однако по содержанию изученных витаминов плодовые тела *P. ostreatus* значительно превосходят *P. sajor-caju*. Плодовые тела обоих видов сравнительно богаты ниацином, содержат рибофлавин и аскорбиновую кислоту (Табл. 3).

Сравнение содержания витаминов группы В в плодовых телах вешенки обыкновенной с содержанием их в пищевых продуктах показывают, что уровень биотина в них в 10 раз выше, чем в яйцах, молоке и шпинате. Концентрация пиридоксина такая же, как в картофеле, но больше, чем в капусте и моркови. Количество тиамин соответствует содержанию его в овсяной крупе, пшеничном хлебе, фасоли и капусте.

Таблица 1. Аминокислотный состав биомассы *P. ostreatus*, выращенной на картофельной муке с кукурузным экстрактом

Название аминокислоты	Содержание аминокислоты, г/100 г белка	Норма ФАО
Аспарагиновая	6,36	4,0
Треонин	3,53	
Серин	3,73	
Глютаминовая	14,27	
Пролин	3,06	
Глицин	3,39	
Аланин	4,08	6,0
Валин	3,27	3,5
Метионин + цистеин	3,54	4,0
Изолейцин	3,71	7,0
Лейцин	5,63	6,0
Тирозин + фенилаланин	5,05	5,5
Лизин	4,68	
Гистидин	2,09	
Аргинин	5,08	
Сумма аминокислот	72,36	
Сумма незаменимых аминокислот	28,32	36,0

Содержание золы составляет 2,1 – 9,8 у *P. ostreatus* и 6,4 – 6,7 у *P. sajor-caju* (% от сухой биомассы).

Плодовые тела этих двух наиболее тщательно исследованных видов вешенки отличаются также по содержанию минеральных элементов.

Это, вероятно, связано с различиями в составе субстратов, на которых они культивируются. В наибольшем количестве в плодовых телах *P. ostreatus* обнаружены калий, фосфор, натрий и магний, у *P. sajor-caju* – фосфор, натрий и магний, причем в базидиомах *P. ostreatus* содержится почти в два раза больше Ca^{2+} , чем у *P. sajor-caju*.

Таблица 2. Аминокислотный состав белка *P. ostreatus* и *P. sajor-caju*.

Название аминокислоты	Аминокислоты, мг/г белкового азота	
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>
Аспарагиновая	564-638	715
Треонин	264-324	353
Серин	271-345	331
Глутаминовая	890-1266	1792
Пролин	269-321	280
Глицин	273-315	353
Аланин	404-451	443
Цистеин	29-32	90
Валин	309-364	377
Метионин	90-108	131
Изолейцин	266-299	313
Лейцин	310-610	478
Тирозин	184-210	445
Фенилаланин	216-260	394
Гистидин	87-120	157
Лизин	250-321	399
Аргинин	306-374	441
Триптофан	61-97	88
Сумма незаменимых аминокислот	2059-2415	2639
Сумма аминокислот	5169-6232	7596

Состав липидов вешенки ранее практически не исследовали. Особенно это относится к составу фосфолипидов. Есть данные по жирнокислотному составу. Качественный состав жирных кислот и их количественное содержание у *P. ostreatus* варьирует в довольно широком диапазоне.

Из насыщенных жирных кислот преобладает стеариновая, которая составляет до 23% от суммы жирных кислот, однако основное содержание жирных кислот приходится на олеиновую – 50% (Табл. 5).

Таблица 3. Содержание витаминов в плодовых телах вешенки.

Название	Витамин, мг/г сухой массы	
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>
Тиамин	48–84	0,2–0,6
Рибофлавин	24–47	12–14
Ниацин	399–1087	182–213
Пиридоксин	4	–
Пантотеновая кислота	$10,3 \times 10^{-2}$	–
Фолиевая кислота	$353,3 \times 10^{-2}$	–
Витамин B ₁₂	$0,84 \times 10^{-2}$	–
Аскорбиновая кислота	36–150	36–150

Таблица 4. Минеральные элементы (мг/кг сухой биомассы) в плодовых телах вешенки.

Элементы	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>
Ca	330–800	189–400
Mg	5900	1360–1880
Na	300–8370	1580–2560
K	29900–37930	21000–25800
Fe	152–334	50–116
Cu	192–219	–
Co	2,1–3,7	–

Состав липидов плодовых тел *P. ostreatus* по соотношению ненасыщенных и насыщенных жирных кислот сходен с составом масел растительного происхождения. Изменения в составе липидов вешенки и шампиньона в процессе онтогенеза с использованием современной приборной техники были изучены в Институте микробиологии РАН только в начале 90-х годов. Обнаружен интересный факт, что наиболее богаты липидами базидиоспоры этих грибов, причем содержание липидов у вешенки достигает 58%. Наименьшее количество липидов содержит мицелий (2–3%), шляпки грибов более богаты липидами, чем ножки.

Таблица 5. Жирнокислотный состав липидов плодовых тел вешенки.

Название жирной кислоты	% от суммы жирных кислот
Миристиновая	0,5–2,4
Пальмитиновая	7,4–15,1
Пальмитолеиновая	0,2–0,5
Стеариновая	14,1–19,8
Олеиновая	15,5–50,0
Линолевая	1,2–13,4
Линоленовая	2,7–16,4

Наиболее богаты фосфолипидами ножки плодовых тел. Преобладающим фосфолипидом вешенки является фосфатидилхолин, содержание которого может достигать 50% от суммы фосфолипидов. Установлено, что мицелий *A. bisporus* и *P. ostreatus* отличаются высоким содержанием стеринов (20%) и эфиров стеринов. Использование хромато-масс-спектрометрии позволило обнаружить в липидах агариковых грибов арахидоновую кислоту и ряд необычных, впервые идентифицированных у Agaricales жирных кислот – C_{20:2} и C_{20:0} (в ножке плодового тела). Эти кислоты свойственны морским моллюскам и представляют определенный медицинский интерес.

В литературе имеется указание, что наиболее богаты по питательной ценности базидиомы вешенки с диаметром шляпки 5–8 см, выращенные на стеблях кукурузы. В зависимости от субстрата химические показатели, особенно содержание белка, могут очень сильно варьировать. Калорийность плодовых тел вешенки составляет 1000 – 3700 ккал/кг, что практически соответствует плодовым телам *Agaricus bisporus* и превосходит многие овощи, в частности картофель.

Таким образом, по химическому составу и питательной ценности плодовые тела вешенки, в особенности, по содержанию незаменимых аминокислот, соответствуют бобовым, по содержанию витаминов превосходят многие овощи, а в их минеральный состав входят все микроэлементы, необходимые для питания человека.

Учитывая приведенные выше данные по химическому составу вешенки, а также особые физиологические свойства этого гриба, обеспечивающие экономически выгодные условия его культивирования, не вызывает удивление тот факт, что вешенка становится серьезным конкурентом шампиньона двуспорового. Особо важным является наблюдение, что вешенка, в отличие от шампиньона, способна накапливать при глубинном культивировании биомассу в таких количествах, которые делают выращивание погруженного мицелия экономически выгодным. Важным оказался и тот факт, что глубинный мицелий вешенки богаче биологически активными соединениями, чем плодовые тела (Табл. 6).

Таблица 6. Химический состав глубинного мицелия и плодовых тел вешенки.

Показатель, % от сухой массы	Плодовые тела	Глубинный мицелий
«Сырой протеин»	33,6	45,0
Истинный белок	22,0	28,5
Липиды	5,4	7,0
Зола	5,4	3,9
Углеводы	43,5	38,2

Более поздние данные, полученные в ИНМИ РАН, позволяют заключить, что плодовые тела вешенки обнаруживают наиболее благоприятное сочетание белка и липидов – 5 : 1, что рекомендуется в современных диетах для предотвращения ожирения и снижения уровня холестерина. В плодовых телах вешенки содержится до 26% белка. Усвояемость белка этого гриба составляет 89–92%. Интересно, что шляпки содержат больше белка, чем ножка. Таким образом, на основе химического анализа вешенку можно рассматривать как готовый медицинский препарат, содержащий (см. ниже) антистрессовые углеводы, полисахариды с антираковой активностью, обладающие выраженной сорбционной способностью в отношении тяжелых и радиоактивных металлов.

1.1.2. Химический состав и питательная ценность японского гриба

Общее название: *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler

Синонимы: Shiitake (японское “Shii-Mushroom”), Золотой дубовый гриб, Черный лесной гриб, Дубовый гриб, Китайский гриб, Шианту-гу или Шианг-Ку, Донка, Пасания.

Первоначально описан как *Agaricus edodes* (Berkley, 1877). В настоящее время гриб отнесен к роду *Lentinula*.

Таблица 7. Химический состав плодовых тел *L. edodes*.

Элементы	Шляпка	Ножка
Медь (мкг/г)	15,4	9,1
Железо (мкг/г)	88,5	46,5
Цинк (мкг/г)	–	83,0
Марганец (мкг/г)	37,2	60,9
Азот (мг/г)	37,5	13,9
Калий (мг/г)	33,9	27,3
Фосфор (мг/г)	10,7	18,9
Натрий (мг/г)	0,2	0,5
Кальций (мг/г)	0,2	0,6
Магний (мг/г)	1,9	3,8

Таблица 8. Основные компоненты свежих грибов *L. edodes* (%)

Компонент	Шляпка	Ножка
Зола	0,9	0,6
Сырой жир	0,2	0,1
Сырой белок	1,9	1,7
Сахара	5,9	10,9

Таблица 9. Содержание витаминов (мкг/100 г) в сырых плодовых телах *L. edodes*.

В условиях внутреннего культивирования	390
В условиях наружного культивирования	78

Таблица 10. Содержание полисахаридов (%) в сухих плодовых телах *L. edodes*

Шляпка	38,3–39,5
Ножка	48,7–51,6
Мицелий	53,5–59,3

Таблица 11. Содержание необходимых аминокислот (г/100 г) в плодовых телах *L. edodes*

Аминокислота	Мицелий	Плодовое тело
Аргинин	1,25	7,0
Гистидин	0,393	1,8
Лейцин	1,92	7,0
Изолейцин	1,35	4,4
Лизин	0,799	3,5
Тирозин	0,81	3,5
Метионин	0,355	1,8
Фенилаланин	1,18	5,3
Валин	1,19	5,2

В отличие от имеющихся в литературе данных о липидах *P. ostreatus*, жирнокислотный состав липидов *L. edodes* исследован в ИНМИ РАН более подробно.

102 Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных...

Таблица 12. Содержание необходимых аминокислот (г/100 г) в плодовых телах *L. edodes* в зависимости от условий получения

Аминокислота	Сухие плодовые тела	Приготовленные в пищу
Аргинин	0,648	0,089
Гистидин	0,159	0,022
Лейцин	0,679	0,093
Изолейцин	0,405	0,055
Лизин	0,348	0,047
Тирозин	0,323	0,044
Треонин	0,497	0,068
Метионин	0,179	0,025
Фенилаланин	0,486	0,067
Триптофан	0,031	0,044
Валин	0,486	0,067

Таблица 13. Содержание жирных кислот в шляпках *L. edodes* (г/100 г) в зависимости от условий получения

Жирные кислоты	Сырые плодовые тела	Приготовленные в пищу
Мононенасыщенные	0,307	0,140
Полиненасыщенные	0,140	0,031
Насыщенные	0,247	0,095

Таблица 14. Состав фосфолипидов плодов тел *L. edodes*

Фосфолипиды	% от суммы фосфолипидов
ФХ	37,1
ФЭА	24,3
ФС	17,8
ФИ	9,2
ФГ	5,2
ДФГ	5,2
Другие	6,4

Эти данные свидетельствуют о том, что в плодовых телах *L. edodes* содержится много ФХ и ФЭА, имеющих медицинскую значимость (см. ниже) и высокий уровень незаменимой линолевой кислоты – соединения, также очень ценного для медицины.

Сиитаке является одним из наиболее древних среди культивируемых грибов. Этот гриб начали выращивать 1000 или даже 2000 лет назад в Китае, Корее и на острове Тайвань. Значительно позже в этих странах стали культивировать еще один гриб – дрожалку, или белый гриб-желе, или серебряное ухо.

Грибы в России выращиваются, в основном, в агрокомплексах Подмосковья и верхнего Поволжья (основные производители – компания «Ледово» (марка Снежана), «Хладокомбинат Западный», «Ледяной мир», Томская производственная компания). Учитывая запросы населения, можно сказать, что у российского грибоводства имеются большие перспективы – за последние пять лет производство культивируемых грибов выросло на 38%, хотя потребительский спрос на грибы растет в среднем на 40–50% в год.

Литература

- Александрова Е.А., Завьялова Л.А., Терешина В.М., Гарибова Л.В., Феофилова Е.П. Получение плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (BERK.) SING. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 649–654.
- Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. К.: Изд-во АН СССР, 1983. 312 с.
- Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Пархоменко Л.П. и др. Опыт глубинного выращивания мицелия *Pleurotus ostreatus* на комплексных средах. В сб: Производство высших съедобных грибов в СССР. Киев: Наукова Думка, 1978. С. 29–32.
- Гарибова Л.В. В царстве грибов. М.: Изд. дом «Прибой», 1998. 224 с.
- Гарибова Л.В. Грибы от А до Я. М.: Изд-во ЗАО «Фитон», 2004. 192 с.
- Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Пленина Л.В., Пучкова Т.А., Осадчая О.В. Состав и биологическая активность глубинного мицелия ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* // Прикл. биохимия и микробиол. 2003. Т. 39. № 1. С. 69–73.

- Михайлова М.В., Феофилова Е.П., Шумская Г.Г., Шевцов В.К. Изменения в составе липидов в процессе цитодифференцировки грибов порядка Agaricales // Прикл. биохимия и микробиология 1995. Т. 29. Вып. 2. С. 315–319.
- Переведенцева Л.Г. и Переведенцева Л.Г. В.М. Грибы России. Книга 1. Пермь: Изд-во Пермского гос. пед. унив., 1995. 190 с.
- Промышленное культивирование съедобных грибов. Под ред. И.А. Дудки. Киев: Наукова думка, 1973. 264 с.
- Решетникова И.А. Мицелий грибов как источник кормового и пищевого белка. Изд-во МГУ, 1989. 55 с.
- Соломко Э.Ф. Высший съедобный базидиальный гриб вешенка обыкновенная *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. как продуцент биомассы пищевого назначения (Медико-биологический аспект). Киев: Инст. ботаники им. Н.Г. Холодного АН УССР, 1988. 54 с.
- Феофилова Е.П., Горнова И.Б., Меморская А.С., Гарибова Л.В., Терешина В.М. Липидный состав плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (BERK.) SING. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 655–659.
- Jones K. Shiitake. The healing mushroom. Rochester–Vermonts: Healing Arts Press, 1995. 120 p.
- Przybylowicz P., Donoghue J. The art and science of mushroom cultivation. Shiitake growers handbook. Dubuque, Iowa: Hunt publishing company, 1990. 217 p.

Глава 2

Лекарственная ценность грибов

2.1. Лекарственные свойства агариковых и других мицелиальных грибов

2.1.1 Липиды как лекарственные препараты

2.1.1.1. Эссенциальные жирные кислоты

“Эссенциальными” считают жирные кислоты, которые не могут синтезироваться организмом, но которые необходимы для нормальных процессов метаболизма. Такое ограничение связано с тем, что в организме млекопитающих удлинение углеродной цепи происходит лишь до C_{18} -состояния, и, кроме того, двойные связи могут вводиться лишь в четыре положения: Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 , Δ^9 . У ферментных систем млекопитающих отсутствует способность образовывать двойные связи при атоме углерода, локализованном между терминальной метильной группой и атомом углерода C_9 ацильной цепи.

Это приводит к тому, что данные живые системы не способны синтезировать линолевую (18:2 ω 6) и γ -линоленовую кислоты (18:3 ω 6), которые необходимы для нормальной жизнедеятельности, и, следовательно, они должны поступать в организм вместе с пищей. Эти две кислоты являются предшественниками для биосинтеза C_{20} -полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые, в свою очередь, являются предшественниками ряда эйкозаноидов. Некоторые авторы относят C_{20} -ПНЖК к эссенциальным (незаменимым) жирным кислотам, однако чаще данные кислоты называют условно эссенциальными, оставляя термин эссенциальные в строгом значении только для линолевой и линоленовой кислот.

В ряду фармацевтических и парафармацевтических средств препараты, содержащие эссенциальные жирные кислоты (витамин F-99, Мористерол, Эссенциале, Интралипид, Липофундин, Флюосол, Липозин, Трив: 1000, Эссавен, Полиен, Эйконол, Эйковит, Фитос-F), широко используются для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена. Одна из жирных кислот – эйкозапентаеновая – обладает высокой биологической активностью и эффективна при коронарной и почечной недостаточности, атеросклерозе, псориазе, инсулинозависимом диабете, злокачественных новообразованиях.

Высокая биологическая активность ПНЖК стимулирует исследования по созданию лекарственных средств, используемых как в отечественной, так и зарубежной медицинской практике.

Базидиомицеты могут быть использованы как источники получения липидов, которые находят применение как медицинские препараты. Проведенные исследования по составу липидов высших грибов, начатые еще в 60-е годы, показали, что в мицелии шляпочных грибов преобладает линолевая кислота ($C_{18:2}$, $\Delta^{9,12}$), составляющая до 70 – 80% от суммы жирных кислот. Впервые это было показано на примере *Calvatia gigantea*, у которой количество $C_{18:2}$ составляло до 75%. Из насыщенных кислот у базидиомицетов преобладает пальмитиновая, остальные жирные кислоты ($C_{18:3}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$) составляют незначительный процент. Есть и полиненасыщенные жирные кислоты.

Отмеченная выше закономерность в жирнокислотном составе *P. ostreatus* и *L. edodes* – очень высокий уровень $C_{18:2}$ – характерна, по нашим данным, и для других базидиомицетов – *Kuehneromyces mutabilis*, *A. bisporus* и др. (см. Табл. 15). Однако наибольшее количество линоленовой кислоты образует все же *P. ostreatus*, и липиды этого гриба более ненасыщенные, чем липиды *A. bisporus*.

Обращает на себя внимание и тот факт, что *P. ostreatus* содержит достаточно редкую гептадеценовую кислоту ($C_{17:1}$), которой медики придают особое значение при составлении современных диет для бизнесменов. На факте, что базидиальные грибы способны синтезировать почти 80% $C_{18:2}$, следует остановиться особо. Известно, что к незаменимым жирным кислотам относят

только линолевую ($C_{18:2}$) и линоленовую ($C_{18:3}$) кислоты, которые не синтезируются в организме млекопитающих.

Таблица 15. Жирнокислотный состав липидов плодовых тел (шляпок) грибов разных трофических групп.

Вид гриба	Степень ненасыщенности	Жирные кислоты, (% от суммы)							
		14:0	16:0	17:0	17:1	18:0	18:1	18:2	18:3
<i>A. bisporus</i>	1,51	1,8	12,6	1,2	0,1	5,0	8,9	68,8	1,6
<i>A. balchascchiensis</i>	1,40	1,7	13,5	1,1	1,4	6,2	9,0	65,3	1,8
<i>P. ostreatus</i>	1,52	2,3	8,1	4,2	0,5	4,0	10,2	70,6	0,1
<i>K. mutabilis</i>	1,58	2,2	7,2	2,3	10,8	3,2	3,4	68,8	2,1
<i>L. edodes</i>	1,40	1,1	24,1	Сл	Сл	3,0	4,8	65,4	1,6

Кроме этих жирных кислот организму нужна еще одна незаменимая кислота – арахидоновая (АК) (5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота). АК относится к $\omega 6$ – группе незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Если с пищей поступает достаточное количество линолевой кислоты, то потребность организма в АК может быть полностью удовлетворена. Арахидоновую ($C_{20:4}$), эйкозапентаевою ($C_{20:5}$), эйкозагексаеновую ($C_{20:6}$) некоторые авторы относят к эссенциальным (незаменимым) жирным кислотам.

Однако в организме эти кислоты, как уже упоминалось выше, могут синтезироваться из предшественников $C_{18:2}$ и $C_{18:3}$, поэтому $C_{20:4}$, $C_{20:5}$ и $C_{20:6}$ чаще называют условно эссенциальными. АК необходима для образования обширной группы физиологически и фармакологически активных соединений – эйкозаноидов. К ним относятся простагоиды (простагландины, простацклины, тромбоксаны) и лейкотриены. Все эти соединения выполняют в организме чрезвычайно важные функции: регулируют приток крови к определенному органу, влияют на кровяное давление, контролируют транспорт ионов через мембрану и т.д.

АК играет важную роль в диетпитании и медицине: предотвращает атеросклероз, коронарные болезни сердца и т.д. Ее ис-

пользуют для приготовления питательных смесей для грудных детей. АК содержится в печени и желтке куриных яиц, но в очень малых концентрациях, поэтому в настоящее время АК получают с помощью мицелиальных грибов рода *Mortierella*, например, *M. alpina*. Промышленное производство мицелиальных грибов с высоким содержанием в биомассе АК (до 70 %) существует в Италии и Китае. АК входит в состав смесей для грудных детей в 60 странах мира и широко применяется в качестве пищевой добавки.

Анализ данных по биотехнологическому методу получения АК позволяет предположить, что наиболее прогрессивным будет совмещение технологии получения биодизеля (отход этого производства – глицерин) с производством АК. Глицерин служит источником углерода для продуцента АК (грибы рода *Mortierella*), что приводит к значительному удешевлению конечного продукта – ПНЖК на основе генетически стабильных продуцентов-трансформантов, способных к сверхсинтезу эссенциальных жирных кислот.

Штамм гриба *Mucor* ИНМИ, полученный в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, способен синтезировать липиды, содержащие γ -линоленовую кислоту ($C_{18:3}$, $\Delta^{6,9,12}$; семейство $\omega 6$) в высокой концентрации. Содержание γ -линоленовой кислоты в липидах зависит от условий выращивания гриба: от вида источника углерода и азота, от режима углеродного и азотного питания.

При использовании в качестве источников питания глюкозы и мочевины в режиме подпитки уровень γ -линоленовой кислоты в липидах достигал 45% от суммы жирных кислот. Изучение распределения кислоты среди разных классов липидов показало, что самая высокая ее концентрация (более 30%) наблюдалась в жирных кислотах фосфолипидов – фосфатидилхолине (ФХ) и фосфатидилэтаноламине (ФЭА), а также во фракции свободных жирных кислот (СЖК) (более 40%). Относительное содержание фосфолипидов в общих липидах при этом составляло 15%. В триацилглицеринах (ТАГ) уровень γ -линоленовой кислоты достигал 22% в сумме жирных кислот. Содержание ТАГ – основной фракции липидов – изменялось от 25 до 50% в зависимости от

условий выращивания культуры: соотношения С/Н, концентрации источника углерода. Использование последовательной экстракции липидов этанолом и гексаном позволяет получить фракции липидов с преимущественным содержанием фосфолипидов или ТАГ. Полученное «γ-линоленовое» масло может содержать более 90% ТАГ. Показано, что γ-линоленовая кислота эффективна при лечении аллергических дерматитов, обладает высокой репаративной активностью при заживлении ран и ожогов. Ее использование снижает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, артрозов, диабета, раковых заболеваний, в частности, опубликованы результаты о подавлении развития рака поджелудочной железы и усилении эффекта противораковой терапии.

2.1.1.2. Нейтральные липиды мицелиальных грибов

Среди нейтральных липидов грибов определенный интерес медиков вызывают каротиноиды, а также стерины, убихиноны и пренолы. Каротиноиды – это широко распространенные терпеноидные пигменты. Накопленные к настоящему времени данные показывают, что каротиноиды могут защищать организм от заболеваний, вызываемых свободными радикалами, например катаракта и склероз и, что особенно важно, влияют на раковые опухоли.

Каротиноиды получают двумя способами: химическим синтезом, например β-каротин, и биотехнологическим способом. Последним способом получают, кроме β-каротина, и такие каротиноиды как лютеин, зеаксантин, ликопин и др. В настоящее время в биотехнологии применяют несколько способов увеличения выхода каротиноидов:

- **Использование химических соединений.** Например, для стимуляции синтеза ликопина у грибов *Blakeslea trispora* в течение ферментации добавляют такие соединения как N,N-диэтилалкиламин, метилгептенон, имидазол, производные пиридина. При этом выход ликопина может быть увеличен до 1,5%.
- **Освещение и температурное воздействие.** Так, синтез каротиноидов у *Rhodotorula glutinis* значительно увели-

чивается при освещении «белым» светом, в частности, возрастает уровень тогулародина. У *Miscor gouxii* выход каротиноидов увеличивается в три раза при культивировании мицелия при 40 °С в аэробных условиях по сравнению с контролем (при 28 °С).

- **Добавлением в среду выращивания металлов и солей.** Например, в присутствии следовых количеств (0,01 мкм) меди, железа и магния уровень каротиноидов у *B. trispora* можно увеличить почти в семь раз.
- **Модификации в метаболических путях при использовании рекомбинантной ДНК** позволяют некаротиногенный организм превратить в активного синтетика этих пигментов. С этой целью используют такие грибы как *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygomonas mobilis*.
- **Совместное культивирование гетероталличных штаммов муконовых грибов**, отличающихся в половом отношении (штаммы обозначают как (+) и (-)) и образующих половые споры – зиготы – только при совместном культивировании.

Этот феномен получил название гетероталлизма (см. выше), и в биотехнологической практике его используют для увеличения выхода миколикопина, убихинона и других нейтральных липидов, имеющих медицинское значение.

Феномен гетероталлизма достаточно широко используется в биотехнологии для получения ряда изопреноидных соединений, в частности β-каротина и ликопина. Терапевтический эффект каротиноидов является многоплановым, и именно это обеспечивает этим пигментам большую медицинскую значимость. Каротиноиды влияют на ряд заболеваний, которые стали наиболее распространенными в XXI веке, причем в настоящее время особое внимание каротиноидам, как антиоксидантам, придается при лечении катаракты и некоторых дефектов сетчатки.

В середине XX века β-каротин считался панацеей от многих заболеваний, и его добавляли в хлебные продукты, конфеты, кондитерские и другие пищевые изделия. В то время химический синтез этого каротиноида стоил еще достаточно дорого, и представляло интерес разработать биотехнологический способ

получения каротина. В связи с тем, что создание биотехнологии получения каротиноидов внесло много нового в эту науку, мы сочли возможным более подробно остановиться на ряде биотехнологических приемов, которые потом использовались для получения других БАВ из грибов, в частности пренолов и, особенно убихинона, широко применяемого в косметике.

Биотехнологический способ получения β -каротина.

Первый регламент получения β -каротина биотехнологическим способом с использованием гетероталлических штаммов *B. trispora* в 20-литровых ферментерах был предложен еще в 1963 году. Однако этот способ не нашел дальнейшего использования, так как стоимость микробиологического каротина оказалась выше, чем получаемого путем химического синтеза. Прошло несколько десятилетий, и симпатии людей обратились в сторону природных пищевых и лекарственных препаратов.

В связи с этим микробиологический способ получения каротина начал активно развиваться и, несмотря на то, что каротин можно было получать из бактерий, водорослей, растений и грибов, чемпионами стали гетероталлические штаммы *B. trispora*. Они способны в условиях завода (10-кубовые ферментеры) стабильно образовывать до 3–4 г/л каротина, что сразу значительно снизило стоимость этого изопреноида и сделало производство экономически выгодным.

Однако для этого понадобились многочисленные исследования, позволившие создать высокоактивные штаммы и подобрать соответствующие условия культивирования. В 80-е годы прошлого столетия определенные успехи были достигнуты при получении спонтанных мутантов, которые позволили в условиях завода увеличить выход каротина на 10–15%. Несколько позже были разработаны методы с использованием мутагенных соединений. С этой целью, например, споры *B. trispora* экспонируются с N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуамидином в течение 30 минут в 100 мг мутагена (выживаемость спор около 1%). Выход каротиноидов выше у супержелтого мутанта (в 6 раз выше, чем у других мутантов и дикого штамма). Однако такие мутанты в заводских условиях достаточно быстро теряли свою активность, и в ферментере наблюдалось вытеснение этих штаммов дикими.

Следует также отметить, что повышение уровня β -каротина у *B. trispora* путем генетических комбинаций возможно в более умеренных пределах, чем, например, у *Phycomyces blakesleeanus*, и такие штаммы в производственных условиях недолго сохраняют свою активность.

Известно, что поднять продуктивность штаммов можно повышением уровня или активности соответствующих ферментов или изменением биосинтетического пути с использованием рекомбинантных ДНК. Последний метод дает возможность получать каротиноиды у штаммов микроорганизмов, неспособных к синтезу этого пигмента. Например, были получены штаммы *Candida utilis*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, способные синтезировать не только β -каротин, но и ликопин, однако такие микроорганизмы не нашли практического применения из-за низких и нестабильных выходов конечного продукта.

Большое значение имели исследования, позволившие увеличить выход конечного продукта путем изменения условий культивирования. В конце XX века наиболее высокий выход каротина получали при совместном культивировании (+)- и (-)-штаммов мукорового гриба при использовании среды, содержащей соевую и кукурузную муку, фосфат калия, тиамин и не менее 4% растительного масла. В качестве стимуляторов каротиногенеза рекомендованы многочисленные соединения, например, β -ионон, керосин, линолевая кислота, ряд гетероциклических соединений и антиоксиданты.

В связи с тем, что стимуляторов синтеза каротина у *B. trispora* предложено достаточно много, целесообразно классифицировать их согласно химическому строению.

Терпеноиды. Основными найденными стимуляторами среди терпеноидов были 2,2,6-триметилциклогексанол, α - и β -пинены, α - и β -иононы и α - и β -метилюноны, а также гераниол. Наибольший выход β -каротина получили при совместном действии 2,2,6-ацетил-1-циклогексана (1 г/л) и β -ионона (1 г/л), однако в практике до сих пор применяют один β -ионон (0,1%) на фоне растительного масла.

Отходы производства. Это – цитрусовая пульпа, цитрусовая меласса, биомасса некоторых мицелиальных грибов, дрож-

жей и бактерий. При концентрации цитрусовой пульпы (3–5%) выход каротина был выше, чем с β -иононом (102–120 мг/100 мл против 101,3 мг в контроле с β -иононом). Активным стимулятором в цитрусовой мелассе является фракция органических кислот, а в твердом остатке – сахароза. Биомасса мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий также увеличивает выход каротина, но в меньшей степени, чем цитрусовая пульпа, а стимулирующий эффект биомассы объясняется действием органических кислот цикла Кребса.

Гетероциклические азотсодержащие стимуляторы. Наиболее интересен формилпиридин, который в концентрации 0,0025% стимулирует синтез β -каротина на 184% по сравнению с контролем. Повышение концентрации формилпиридина до 0,05–0,2% увеличивает образование каротина до 220–173%. Хороший эффект дает совместное действие 4-оксипиридина (0,3%) вместе с β -иононом или триметилциклогексаном. Активными стимуляторами синтеза β -каротина могут быть также α -пирролидин, сукцинамид, нембутал, изоникотин и изониазид. Эти соединения используют на фоне β -иона или 2,6,6-триметил-1-ацетилциклогексана. Синтез β -каротина стимулируют также пиридазин (на 68%); пролин (на 6%) и изоникотинэтилгидразин (в концентрации 0,75%, выход β -каротина составляет 2730 мг/л, т.е. почти на 200% по сравнению с контролем). Все эти стимуляторы вносятся после окончания периода интенсивного роста биомассы. Получены также данные о стимулирующем действии фенолпроизводных – диметилфталата и вератрола.

Добавки неионных ПАВ для стимуляции синтеза β -каротина у *V. trispora*. С целью увеличения образования триспоровых кислот (считается, что это должно стимулировать образование каротина) добавляли в синтетическую среду (70 г L-аспарагина, 2 г дрожжевого экстракта, 1 г KH_2PO_4 , 1,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, тиамин гидрохлорид – 5 мг в 1 л дистиллированной воды) антиоксидант и Span 20. В результате уровень каротина увеличивался в 15 раз и достигал 2,3 г/л по сравнению с той же средой, но без ПАВ. Одновременно в 15 раз возрос уровень триспоровых кислот (8,8 мг на 2 г сухого мицелия, а без Span

20 – 0,6 мг/л). Полагают, что ПАВ непосредственно влияют на уровень триспоровых кислот, а те, в свою очередь, увеличивают выход каротина.

Действие бензуранов на образование каротина. Установлено, что производные мочевины (фторбензуран и другие) также стимулируют синтез каротина. Например, слабым стимулирующим эффектом обладает 3,4-дихлоранилин. Интересно, что образование каротина стимулируется твинами, например, твином 20, приблизительно в 1,5 раза, а также мочевиной.

Кроме химических соединений, выход каротина удалось увеличить путем использования других факторов, например, действием света различного спектрального состава и кислорода. Белый свет влияет на спорообразование *B. trispora*, и это используется в заводской практике ((+)- и (-)- штаммы после выдерживания в темноте в течение 3–4 суток подвергают освещению в течение 48–56 часов). В начале 90-х годов в лаборатории экспериментальной микологии ИНМИ РАН было показано, что ультрафиолет ингибирует, синий и красный свет оказывают нейтральное действие, и только зеленый свет стимулирует спороношение *B. trispora*.

Более подробные исследования показали, что зеленый свет существенно влияет на спорогенез (+)- и (-)-штаммов, однако для каждого штамма должны быть подобраны соответствующие режимы, причем (+)-штамм является более активным спорообразователем. Установлен интересный факт: если в качестве посевного материала использовать споры, образованные при освещении ЗС, то выход каротина в мицелии будет выше, по сравнению с мицелием, выросшем из «темновых» спор (7944,8 и 596,4 мг/л соответственно, на 4-е сутки, кукурузно-соевая среда без масла и без β -иона).

Содержание кислорода в ферментере также влияет на выход каротина. Чтобы создать соответствующую концентрацию кислорода (более 50% от уровня насыщения), насыщали среду чистым кислородом и одновременно для предотвращения вспенивания среды в ферментере добавляли поверхностно активное вещество Span 20 (сурфактант). При контроле уровня кислорода и вспенивания среды можно получить высокую концентра-

цию β -каротина – 1190 мг/л через 6 дней с выходом биомассы *B. trispora* – 2,5% по весу сухого мицелия, т.е. приблизительно в 5 раз выше, чем при обычном культивировании. Интерес представляют данные о стимулирующем действии перекиси водорода на синтез β -каротина (на 46%) у *B. trispora* (выход 152 мг/г сухой биомассы).

В биотехнологическом процессе получения каротина существенное внимание уделяется также химическим характеристикам конечного продукта. Анализ каротиноидов, полученных в 3-кубовом ферментере, проводится обычно методом RP-HPLC. В смеси каротиноидов должен преобладать β -каротин (92–96%), другие каротиноиды составляют 8–4% от суммы всех каротиноидов. β -Каротин в основном представлен all-trans-изомером (90–95%), но есть и 15-cis, 13-cis и 9-cis-изомеры (10–15%). Кристаллический β -каротин имеет различные формы кристаллов в виде 6-угольной пирамиды.

Ферментации, направленные на получение β -каротина с использованием только одного (-)-штамма *B. trispora*. Используя N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, этилметансульфонат (EMS), азотную кислоту, аналоги нуклеотидов, акридин, ультрафиолет, рентгеновские лучи, γ -лучи и комбинации этих мутагенов, получили (-)-штаммы *B. trispora*, способные синтезировать больше β -каротина, чем дикие. Такие штаммы представляют интерес для заводской практики, так как ферментации с одним штаммом более надежны.

С целью увеличения синтеза β -каротина в среду выращивания добавляют гипополипидемические агенты, такие как ловастатин – агент, понижающий уровень стерина (т.е. эргостерина), правастатин, понижающий уровень липопротеина, а также симвастатин.

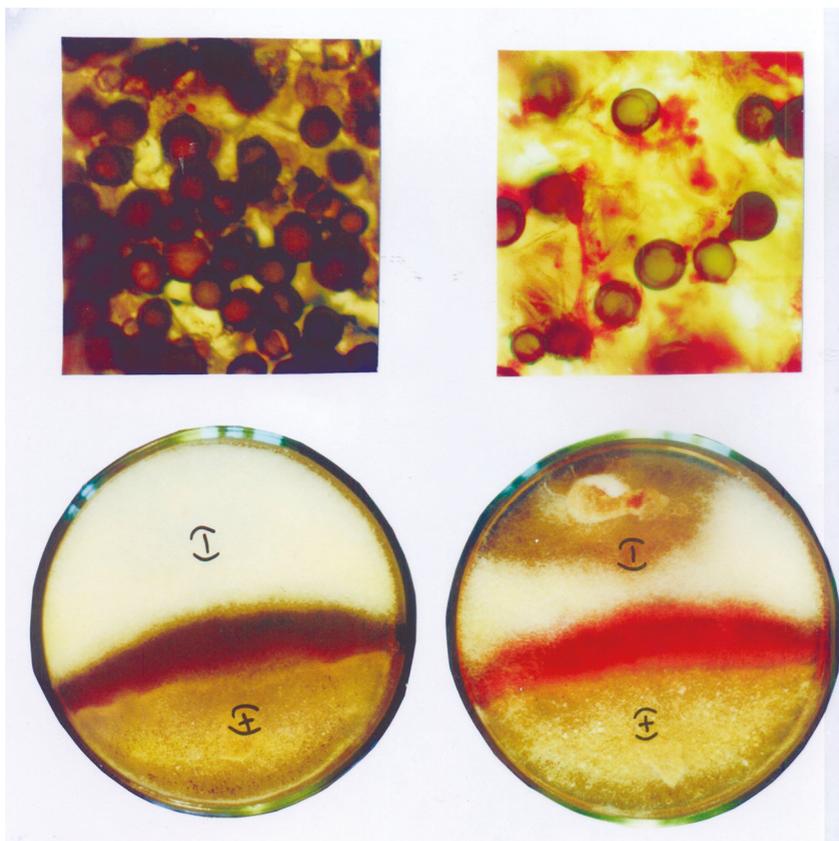
Другой путь увеличения выхода β -каротина – использование ингибиторов синтеза ацетил-КоА, таких как ацетат, аналоги пропионата и бутирата, хлорацетат, фторуксусная кислота, 2-хлорацетамид, хлорацетат. Действию этих соединений подвергали мутантные споры (-)-штаммов *B. trispora*. Выдержавшие влияние этих соединений споры в дальнейшем испытывали как посевной материал для ферментации с целью получения β -каротина.

Еще одно направление для увеличения выхода β -каротина при использовании только одного штамма – экзогенные добавки триспоровых кислот (ТСК). С этой целью используют среду ММ-1, состоящую из хлопкового масла, вытяжки из соевых бобов, фосфата натрия, сульфата магния. После 54 часов ферментации добавляют ТСК и индукторы синтеза β -каротина (β -ионон), можно добавлять керосин (ионизированный), цитрусовую пульпу, цитрусовые масла (лимонен) и α -кетоглутарат (интермедиаты цикла трикарбоновых кислот). Выход каротина может быть увеличен с 0,15 до 1,5 г/л и даже 3 г/л. ТСК получают при совместной ферментации (+)- и (-)-штаммов *V. trispora*. Культуральную жидкость отделяют от мицелия, подкисляют до pH 2, ТСК экстрагируют хлороформом, далее дополнительно очищают обработкой раствором бикарбоната натрия и извлекают хлористым метиленом после подкисления до pH 2,0. Очищенная ТСК имеет E-величину, равную 620 в этаноле.

Вносят ТСК в 24-часовую культуру (-)-штамма. ТСК влияют на фосфолипиды гриба, увеличивая содержание фосфатидилхолина, что сопровождается увеличением содержания β -каротина. Показано, что ТСК, кроме того, стимулируют образование убихинона Q₉ и рибофлавина у (-)-штамма *V. trispora*.

Получение ликопина биотехнологическим методом. Совместное культивирование гетероталлических штаммов *V. trispora* позволяет получать биотехнологическим способом еще один каротиноид – ликопин. Выше отмечалось, что этот каротиноид является самым мощным природным антиоксидантом, и в этом плане представляет значительный интерес для его использования в качестве лекарственного средства в противоопухолевой терапии.

Практически все грибы образуют ликопин, но в очень незначительном количестве. Интенсифицировать его синтез путем ингибирования процесса циклизации можно двумя способами: изменением условий культивирования и путем воздействия на ферменты циклазы. Известно, что культивирование в условиях нейтральной или слабокислой среды способствует интенсификации синтеза ликопина, но количество конечного продукта при таком способе получения является экономически не выгодным.



Влияние МАП на зиготообразование и каротиногенез у *Blakeslea trispora*.

Циклизацию ликопина и его превращение в каротин можно ингибировать, используя замещенные амины и азотсодержащие гетероциклы (азины). На рисунке показано, как 2-амино-6-метилпиридин (МАП) ингибирует не только синтез каротина, но и зиготообразование у продуцента *B. trispora*.

Исследования по поиску стимуляторов ликопинообразования, проведенные в ИНМИ, позволили разработать технологию с использованием МАП, при внесении которого в количестве 0,05 г/л выход ликопина составляет 0,7 г/л среды, и технология

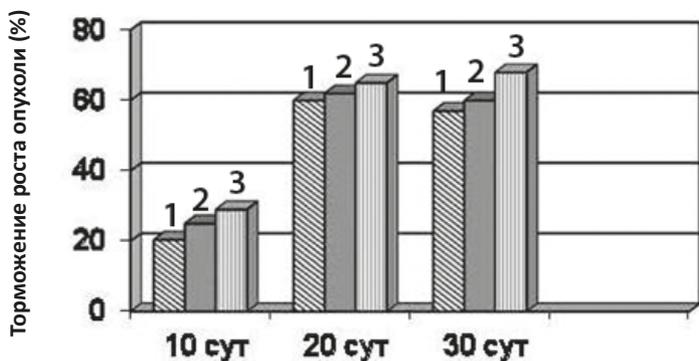
в данном случае удовлетворяет экономическим требованиям. Разработан также способ получения препарата миколикопина, который кроме ликопина содержит фосфолипиды, эссенциальные жирные кислоты, убихинон Q₉ – биологически активные соединения, которые образуются *B. trispora* одновременно с ликопином, и являются ценными медицинскими препаратами.

В настоящее время исследование нового препарата миколикопин продолжают коллективом ученых ИНМИ и ЦКБ РАН с целью выхода на медицинский рынок. В последние годы для получения ликопина используются и генетические методы. Так, получен штамм *S. cerevisiae*, которому трансформирован каротиногенный ген из *Erwinia uredovora*. Этот штамм предложено использовать для получения ликопина.

Это новое биологически активное средство представляет собой желатиновые капсулы, содержащие суспензию 2% ликопина и указанные выше БАВ (убихиноны, эссенциальные жирные кислоты и др.) в подсолнечном масле. В Лаборатории по созданию нетоксичных иммуномодуляторов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН проведены испытания, показавшие, что миколикопин, кроме антиоксидантного, обладает антиаллергенным, анти-мутагенным, радиопротекторным и иммуномодулирующим действием. Причем эти свойства миколикопина выражены интенсивнее, чем в 2% суспензии кристаллического ликопина из грибов (чистота 95%) в подсолнечном масле, например, его радиопротекторное действие в 2 раза выше.

В ИНМИ РАН совместно с ЦКБ РАН было проведено тщательное изучение противоопухолевого эффекта миколикопина на крысах-самцах линии АС1 с перевитой опухолью предстательной железы, полученной из индуцированных новообразований по методике, разработанной в Лаборатории экспериментальной эндокринной терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для сравнения использовали пептидный гормон, аналог люлиберина – сурфагон (суперрилизинг-фактор гонадотропина).

Полученные данные представлены на рисунке и показывают, что противоопухолевый эффект отмечен во всех группах по сравнению с контрольной. Торможение роста опухоли (ТРО) миколикопином (58%) через 20 суток испытаний близко к по-



1- миколипид 2 - сурфактант 3 - совместное введение

Торможение роста опухоли предстательной железы у крыс линии AC1 под действием миколикопина, сурфактанта и их совместного введения.

казателю ТРО для сурфактанта (60%). Наиболее высокий показатель ТРО наблюдается при совместном действии миколикопина и сурфактанта (68%). Было отмечено, что совместное введение этих препаратов обеспечивает лучшее физическое состояние крыс (гладкая шерсть, высокая активность), чем при введении одного сурфактанта. Следовательно, миколикопин по показателю ТРО представляет несомненный интерес для его использования при лечении рака предстательной железы.

В заключение этого раздела необходимо отметить, что пока использование генетически сконструированных штаммов в биотехнологии получения каротиноидов в рутинном производстве обходится слишком дорого и значительно удорожает стоимость конечного продукта. Тем не менее применение таких штаммов становится перспективным, если взамен старым технологиям будут разработаны новые методы ферментаций.

2.2. Полисахариды и связанные с ними белки, обладающие иммуномодулирующим и противоопухолевым эффектами

Наиболее изученными в области химии полисахаридов оказались базидиальные грибы, что связано с тем, что их БАВ обладали явно выраженным иммуномодулирующим действием и противоопухолевой активностью. Полисахариды принадлежат к биологически активным молекулам, они широко распространены в природе и представляют собой полимеры, состоящие из моносахарных остатков, связанных гликозидными связями. Эти соединения участвуют в образовании белков и нуклеиновых кислот, а также в процессах узнавания и взаимодействия клеток у высших организмов.

В конце 80-х годов прошлого столетия были известны три иммуномодулирующих препарата из грибов, обладающих противоопухолевым действием: лентинан, шизофиллан и нуклеиново-белковый комплекс, выделенные из мицелиев *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* и *Coriolus versicolor*. Наибольший интерес с точки зрения прогнозирования и создания препаратов, влияющих на иммунную систему, представляет *L. edodes*. Из этого гриба в 1969 г. группа исследователей из Университета Пердью (Purdue University) в США и Национального центра раковых исследований в Токио получили водный экстракт, который далее ввели мышам, зараженным саркомой 180, и получили положительный эффект.

Позже была установлена принадлежность лентинана к полисахаридам и показано, что основным веществом лентинана является β -1,3-глюкан. Препарат был активен против нескольких видов опухолей. В клеточной стенке грибов, относящихся к Ascomycetes и Basidiomycetes, содержится еще один полисахарид – хитин. Это линейный аминопалисахарид, состоящий из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-D-глюкопиранозных остатков. По химическому строению хитин близок к целлюлозе, а по распространенности в природе занимает второе место после целлюлозы. У высших грибов хитин образует с β -1,3-глюканом прочный комплекс, называемый хитин-глюкановым комплексом (см. выше).

В настоящее время хитин и его деацетилированное производное – хитозан – широко используется в медицине и косметике.

Как и почти все грибные полисахариды, хитин обладает иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями. Кроме того, хитиновые покрытия защищают от γ -излучения, но наиболее привлекательным свойством этого полиаминосахарида, благодаря которому он в настоящее время широко используется в терапии, является активно выраженная ранозаживляющая способность. В пластической хирургии при закрытии раневых поверхностей с XIX века по 1990 год использовали концентрированные растворы перманганата, что вызывало у пациентов отек мягких тканей, трещины и даже кровотечение. Теперь в послеоперационном периоде для закрытия эпидермальной или дермальной раны применяются хитозановые покрытия, которые при наложении на кожу образуют полупроницаемую мембрану, через которую выходит послеоперационный экссудат, что дало возможность не применять перманганат. Кроме того, хитин и хитозан являются активным началом в лекарственных средствах, применяемых для лечения ожогов и ран другой этиологии. Например, препаратом такого назначения является «Микоран», разработанный в Институте микробиологии РАН. Его получают биотехнологическим способом. В качестве продуцента используется мукоровый гриб *Blakeslea trispora* (см. далее).

В последние годы интересы медиков были сосредоточены на изучении лентинана. Этот препарат представляет собой вещество, плохо растворимое в воде и имеющее молекулярную массу 100000 Да. Частичный гидролиз муравьиной кислотой позволяет получать БАВ, названное малым лентинаном, с молекулярной массой 16200 Да, растворимый в воде. Лентинаны содержат D-глюкозные остатки, соединенные β -1,3-глюкозидными связями; как было установлено позже, в небольшом количестве присутствуют также и β -1,6-связи. Противоопухолевая активность значительно более выражена у малого лентинана. Особенно эффективной оказалась комбинация лентинана и интерлейкина 2. Эти данные были настолько обнадеживающими, что предположили, что найдено совершенно новое направление в иммунотерапии рака.

В 1978 г. из мицелия *L. edodes* был получен новый препарат, также ингибирующий рост сарком и обладающий иммуномодулирующей активностью, состоящий из белковых цепей, который назвали К8-2. Высокомолекулярные полисахариды с подобным действием выделены и из других грибов, например из вешенки, из *Coriolus versicolor*, а также из *Ganoderma lucidum* (водорастворимый разветвленный глюкан, содержащий β -1,3-; β -1,4- и β -1,6-связи), из *Flammulina velutipes* (фламмулин с молекулярной массой 24000 Да, представляющий собой одиночный белок). Биологической активностью обладают также гетерогликаны, выделенные из плодовых тел *Hericium erinaceum*, белкосодержащий полисахарид из гриба *Pleurotus osreatus* и полисахариды *Hohenbuehelia* sp. Из гриба *Tricholoma mongalicum* был изолирован полисахарид (PSP).

Наибольшее число полисахаридов-иммуномодуляторов было получено из гриба *Ganoderma lucidum*, широко известного на Востоке. Препарат ганодерон – иммуномодулятор из *G. lucidum* – индуцировал белок с противоопухолевой активностью. Интересно отметить, что почти все вышеуказанные соединения, кроме иммуномодулирующей и противоопухолевой, обладали еще и антивирусной активностью, это, например, полисахарид К8-2 и эритаденин. Репликацию вирусов подавляют и другие препараты, полученные из базидиомицетов. Таким образом, у грибов иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями обладали полисахариды и белки, связанные с полисахаридами, причем активные против рака полисахариды отличались высокой молекулярной массой и большей растворимостью в воде.

Наиболее изучен механизм действия грибных глюканов. Предполагается, что первичными акцепторами грибных полисахаридов являются органо- или тканеспецифичные макрофаги, причем, возможно, глюканы активируют и сами макрофаги. Это, в свою очередь, объясняет благоприятный эффект глюканов при профилактике острых стрессовых состояний, так как активированные макрофаги контролируют метаболизм кортикостероидов и кислых гидролаз.

Следует, однако, отметить, что каждый из указанных выше глюканов (лентинан, шизофиллин и др.) имеют свои специфич-

ческие особенности биологического действия. Так, лентинан не оказывал прямого цитотоксического действия на клетки опухолей. Такой эффект лентинана связан с взаимодействием с Т-клетками и активностью тимус-зависимого иммунного механизма. Другой β -глюкан, полученный в Японии из *Grifola frondosa*, является активатором макрофагов и стимулятором цитокинов. В настоящее время предполагают, что многие грибы образуют иммуномодуляторы – цитокины – и являются медиаторами иммунных свойств белков *in vivo*.

Поэтому многие исследователи, работающие с лекарственными веществами грибов, приходят к выводу, что противоопухолевая активность грибных полисахаридов связана с активацией иммунной системы и образованием иммунных белков. В связи с этим следует указать на одну из последних работ, в которой изучали экстракт из гриба *Polyporus squamosus*, названный PS64. Этот препарат рассматривают как новый иммуномодулятор и считают, что его следует применять для лечения больных с аутоиммунными заболеваниями. Целесообразно отметить еще одно интересное наблюдение, сделанное в процессе накопления данных об условиях культивирования и хранения грибов с полезными медицинскими свойствами. На примере *L. edodes* показано, что выращивание и, особенно, хранение базидиом при более низких температурах увеличивает у них содержание противоопухолевых полисахаридов.

Таким образом, основными веществами грибов, влияющими на иммунную систему, являются полисахариды и белки. Следует особо указать, что полисахариды грибов не действуют непосредственно на раковые клетки, а стимулируют противоопухолевую систему организма, точнее, активность макрофагов. Это белые клетки крови, которые «пожирают» и уничтожают патогенные микроорганизмы, вирусы и т.д., оказывающие влияние на функционирование таких жизненно важных органов, как печень и селезенка. Исследования, проведенные в конце 90-х годов XX века, подтвердили, что такие грибы как *L. edodes*, *P. ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *F. velutipes*, *Tremella faciformis*, *Schizophillum commune* и др. оказывают влияние на активность макрофагов и стимулируют иммунную систему.

В настоящее время противоопухолевые препараты на основе мицелиальных грибов производятся во многих странах. В Японии почти 30% препаратов для лечения онкологических заболеваний получают из грибов. А уникальный гриб шиитакэ включен правительством Японии в программу «Здоровье нации», как один из девяти препаратов, укрепляющих здоровье и увеличивающих продолжительность жизни. Противораковая способность грибов активно исследуется в России – в ГНЦ по антибиотикам (ГНЦА, Москва), ГУ Ивановский НИИ материнства и детства имени В.Н.Городкова Ивановской государственной медицинской академии, на Украине – в Институте ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины.

В последние годы в связи с диагностикой раковых заболеваний медики проявляют интерес к лектинам грибов. Лектины – это гликопротеины неиммунной природы, которые агглютинируют клетки, а также преципитируют полисахариды или глюкострофанты. Лектины использовались ранее в научных целях, например при изучении строения полисахаридов или гликопротеинов. В медицине лектины грибов используют для точечной противоопухолевой терапии, таким лектином может быть N-ацетилгалактозамин-специфический лектин, выделенный из плодовых тел *Grifola frondosa*. Интересно, что этот лектин оказывает цитотоксическое действие в отношении клеток HeLa, что является результатом связывания лектина с углеводными доменами клеток.

Противораковый эффект оказывают также и некоторые терпеноиды базидиомицетов. Наиболее перспективные терпеноиды из *Ganoderma*, имеющие ланостатиновую основу, например ганодеровые кислоты R, T, U-2, выделенные из погруженной культуры этого гриба, ингибируют рост клеток гепатомы *in vitro*.

В последние годы внимание онкологов привлекает цитотоксический препарат «Иллудин S» (трициклический терпеноид), его называют также «Лантерол». Этот терпеноид имеет уникальный механизм воздействия на раковые клетки: первоначально он связывается с глутатионом, далее активированная форма конъюгирует с ДНК, в результате ингибируется репликация ДНК, и раковая клетка гибнет.

Однако «Иллудин S», как и многие антираковые препараты, очень токсичен, и не может применяться как медицинское средство. В настоящее время получен менее токсичный аналог, названный НГ-29 ГМАФ. Он оказывает ярко выраженный терапевтический эффект и проходит медицинские испытания на пациентах в клинике. Полученные данные позволяют надеяться, что из базидиальных грибов может быть получен новый эффективный препарат терпеноидной природы.

В настоящее время эти исследования активно продолжаются в медицинских центрах Японии. Ниже приводится перечень грибов, обладающих противораковой активностью (см. Табл. 16).

Таблица 16. Грибы, обладающие противораковой активностью

Вид гриба	Эффект излечения, %	Ингибирование опухоли, %
<i>P. osreatus</i>	50	75,3
<i>L. edodes</i>	60	80,7
<i>F. velutipes</i>	30	81,1
<i>Pholiota nameko</i>	30	86,5
<i>Armillaria matsutake</i>	55	91,8
<i>L. edodes</i> (водный экстракт)	66	97,3

Как видно из приведенных в таблице данных, вешенка обладает достаточно высокой антиканцерогенной активностью и представляет интерес для создания лекарственных средств.

2.3. Пищевые волокна высших базидиальных грибов

Пищевыми волокнами называют высокомолекулярные биополимеры, которые не перевариваются в желудочно-кишечном тракте, не всасываются и выводятся из организма. Пищевые волокна представлены у высших базидиальных грибов β -глюканами, хитином и гетерополисахаридами (полиуронидами). Эти соединения могут составлять до 50% от веса сухой биомассы мицелия. В связи с тем, что существует категория людей, обладающих синдромом непереносимости грибов, более пер-

спективным является использование пищевых волокон – хитин-глюканового комплекса.

В настоящее время пищевые волокна базидиомицетов рассматриваются как очень ценные в медицинском отношении вещества, которые могут предупредить возникновение рака прямой и толстой кишки. Действие пищевых волокон грибов можно объяснить адсорбированием вредных для организма веществ, в том числе и канцерогенных. Этой особенностью обладают в большей степени хитиновые нити (хитин грибов – высокоактивный сорбент не только канцерогенов, но и ионов тяжелых и радиоактивных металлов). Сорбционные свойства хитина значительно увеличиваются в комплексе с глюканами, причем наличие хитин-глюканового комплекса способствует усилению «слабительного» эффекта.

Таким образом, пищевые волокна грибов, представленные хитин-глюкановым комплексом, являются своеобразной «щеткой», способствующей очистке пищеварительного тракта, чему в настоящее время медики придают особое значение, рассматривая «вялый» желудочно-кишечный тракт как фактор онкологического риска.

Начиная с 2006 г. в совместных исследованиях ЦКБ РАН и ИНМИ РАН проверялось действие пищевых волокон из вешенки: проводились анализы кала на дисбактериоз, определяли липидный спектр, гликированный гемоглобин, содержание глюкозы в крови, вес тела, индекс массы тела. В результате исследований отмечена тенденция к снижению массы тела, нормализация уровня липопротеинов низкой плотности, триглицеридов. Клинические наблюдения за пациентами показали хорошую переносимость препарата и отсутствие нежелательных побочных явлений. Пациенты отмечали уменьшение чувства голода, некоторое снижение аппетита, улучшение работы желудочно-кишечного тракта, уменьшение диспепсических явлений, тенденцию к нормализации стула. У пациентов с сахарным диабетом пищевые волокна грибов помогали стабилизации уровня сахара в крови, сглаживая колебания гликемии в течение дня.

Следует также отметить, что обогащение пищи грубыми пищевыми волокнами способствует снижению уровня холестерина в крови. Напомним, что высокий уровень холестерина – это

фактор риска, приводящий к развитию сердечно-сосудистых заболеваний.

2.4. Препараты из грибов как регуляторы деятельности сердечно-сосудистой системы и уровня холестерина в крови

В настоящее время на первом месте в мире стоит смертность от коронарной недостаточности и других сердечно-сосудистых заболеваний. Высокий уровень холестерина в крови оказывает отрицательное влияние на состояние артерий и является одним из факторов риска развития этих заболеваний.

Борьба с высоким уровнем холестерина в крови включает два этапа:

- Создание диеты, содержащей мало жиров, насыщенных жирных кислот и обогащенной растительными волокнами. Несомненный эффект оказывает введение в рацион грибных блюд.
- Лекарственная терапия, т.е. введение мевинолина (ловастатина). Этот препарат получают из съедобных грибов рода *Pleurotus*, причем самое высокое содержание ловастатина найдено у *P. ostreatus*.

Ловастатин – непрямой ингибитор синтеза белка и индуктор апоптоза у некоторых типов клеток млекопитающих. Было установлено, что введение в пищевую рацион 2–4% грибов *P. ostreatus* приостанавливает накопление углерода и триацилглицеринов, как в сыворотке, так и в печени животных с экзогенной, эндогенной или генетически обусловленной гиперлипидемией.

Значительный интерес представляют данные о том, что водные вытяжки из *P. ostreatus* показали тот же эффект *in vitro*. Потребление грибов также снижает атеросклеротический эффект на 20–40% в сыворотке крови у пациентов с ишемической болезнью сердца. Активным началом, вероятно, является ловастатин, который, как отмечалось выше, в большом количестве содержится в плодовых телах культивируемых видов вешенки, причем это вещество локализовано в шляпке гриба и его очень мало в ножке.

Таким образом, плодовые тела *P. ostreatus* можно рекомендовать как природное средство, снижающее уровень холестерина.

В базидиомах *L. edodes* также содержится средство, снижающее уровень холестерина. Это – эритаденин (лентинацин или лентизин). Его действие связано не с ингибированием синтеза холестерина, а скорее с усилением выведения этого нейтрального липида из организма или его метаболическим разрушением.

Липидемической активностью обладают также экстракты из *Tremella faciformis*, причем у этого гриба наиболее активные экстракты получали из спор. Относительно недавно найден продуцент *Lecanicillium* sp. 16, комплексный препарат из мицелиальной массы которого проявляет высокую гиполипидемическую активность, превышающую активность ловастатина почти в 100 раз. Активным началом препарата является комплекс необычных жирных кислот. Установлено наличие конъюгированных жирных кислот C_{18:2}, содержание которых достигает 50,64%, а также олеиновой кислоты и разветвленных жирных кислот (М.В. Бибикова, И.А. Спиридонова).

2.5. Антидиабетический эффект препаратов из грибов

Диабет – давно известное заболевание, которым в настоящее время болеет приблизительно 250 млн. человек. В последнее время – это наиболее распространенное заболевание в США, в то же время в Китае и, особенно, в Японии сахарный диабет является достаточно редким заболеванием. Медики объясняют это особенностями пищевого рациона и, в частности, высоким содержанием в пище грибов. Наиболее распространенные лекарства против диабета – инсулин и ряд синтетических препаратов. Однако в последние годы появляется все больше данных о возникновении «устойчивости» к химическим антидиабетическим препаратам и об отсутствии их пролонгированного действия.

Антидиабетическим действием обладает гриб *Grifola frondosa*. У группы добровольцев, в рацион которых входил этот гриб, верхний уровень глюкозы в крови после 15 и 30 минут был в 0,64 и 0,76 раза ниже, чем в контрольной группе. Этот тест и другие (определение абсорбционной активности глюкозы

и т.д.) позволили заключить, что антидиабетический эффект грибов обусловлен не ингибированием всасывания глюкозы, а процессом метаболизма сорбированной глюкозы.

Ганодеран А и Б – глюканы из плодового тела *Ganoderma lucidum* – значительно понижают уровень сахара в плазме. Из погруженного мицелия *Trametes versicolor* выделен препарат аналогичного действия кореолан (β -глюкан, связанный с белком), показавший высокую активность при экспериментальном диабете.

2.6. Антибактериальная, антивирусная и антипаразитарная активность грибов

Многочисленная группа грибов образует более 2500 антибиотических веществ разнообразного химического строения, но только небольшая их часть нашла в настоящее время применение в медицинской практике. Но, тем не менее, именно грибы открыли человечеству новую область медицины – антибиотикотерапию, а «виновником» был гриб *Penicillium notatum*, у которого, по наблюдению А. Флеминга (1929), культуральная жидкость подавляла рост патогенных кокков. Содержащееся в культуральной жидкости гриба вещество назвали пенициллином. Но еще до открытия этого лекарственного препарата зеленую плесень использовали племена майя, а в России делали с древнейших времен присыпку, состоящую из специально выращенной грибной плесени. Необходимо отметить, что путь к применению антибиотиков в медицине проложили сульфамидные препараты, среди которых красный стрептоцид – пронтозил – был первым эффективным антибактериальным лекарством, успешно примененным для лечения тяжелых стрептококковых инфекций.

В 40-е годы в СССР в лаборатории биохимии микробов Всесоюзного института экспериментальной медицины под руководством З.В. Ермольевой был выделен первый отечественный пенициллин, который начал активно применяться для лечения ран во время Великой отечественной войны. В 1945 г. был разработан способ получения пенициллина при глубинном культивировании продуцента, причем советский штамм отличался

большей продуктивностью, чем английский. В основу получения промышленного пенициллина был положен принцип двухфазности протекания микробиологических процессов, предложенный академиком В.Н. Шапошниковым.

Необходимо отметить, что именно производство антибиотиков стало революционным событием в развитии не только отечественной, но и мировой биотехнологии. Разработка биотехнологии получения пенициллина впервые показала, что глюкоза может выступать как катаболитный репрессор и снижать выход антибиотика, поэтому в качестве единственного источника углерода в ферментационной среде впоследствии стала использоваться лактоза.

При этом впервые обратили внимание на то, как влияет на выход конечного продукта скорость потребления источника углерода и продукты автолиза мицелия. Еще одним приемом повышения синтеза пенициллина стало добавление его предшественников, в частности фенилуксусной кислоты, которая повышает выход антибиотика на 30–35%. В результате выход пенициллина удалось повысить с 20 Ед./мл культуральной жидкости до 55 Ед./мл.

Среди антибиотиков грибного происхождения наибольший интерес для медицины представляет группа β -лактамных антибиотиков, к которой относятся пенициллины и цефалоспорины. В настоящее время из природных источников частичным или полным синтезом удалось получить около 10 тысяч соединений, имеющих β -лактамное кольцо, из которых большая часть нашла применение в клинике. К группе β -лактамных антибиотиков относятся также цефалоспорины, образуемые грибами из рода *Cephalosporium*. Основным продуцентом является полученный в 1943 г. *Acremonium chrysogenum*. Цефалоспорины действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии, но их антибиотическая активность несколько ниже, чем у пенициллина.

Грибы образуют также антибиотики, не относящиеся к β -лактамным. Это, например, фумагиллин, который относится к группе полиеновых соединений (он особенно интересен тем, что обладает и противораковой активностью), трихотецин, образуемый *Trichothecium roseum*, фузидиевая кислота, проду-

центом которой является *Fusidium coccineum*, циклоспорины, образуемые почвенными грибами (*Trichoderma polysporum*, *Tolyocladium inflatum* и другие).

В последние годы поиски новых антибиотиков начали более интенсивно проводиться среди базидиальных грибов и грибов аскомицетного аффинитета, многие из которых обладают менее выраженным токсикогенным действием (ГНЦ по антибиотикам, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины). У аскомицетного гриба обнаружены новые антибиотики А и Б, которые относятся к углеводам и являются соединениями с близкой структурой: брутто-формула компонента А соответствует $C_{28}H_{38}O_6$. Некоторые метаболиты грибов рода *Phoma*, в частности фомаленовая кислота С, заинтересовала в последние годы медиков, так как эта кислота проявляет сильные антибактериальные свойства в отношении дикого и метициллин-устойчивого штамма *Staphylococcus aureus*. Причем активность фомаленовой кислоты оказалась в 5–32 раза выше известных антибиотиков тиолактомицина и церуленина. Фомаленовая кислота С является сильным ингибитором биосинтеза жирных кислот, что приводит к изменениям в составе липидного бислоя клеточных мембран, замедлению ростовых процессов и может привести к гибели клеток.

По данным, полученным в лаборатории Л.М. Краснопольской, экстракты из шиитаке обладают широким спектром антибиотической активности и ингибируют рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Наибольший интерес представляет тот факт, что *L. edodes* обнаруживает антистафилококковое действие, сочетающееся с фунгицидной и фунгистатической активностями. Антистафилококковым эффектом обладает и *Schizophyllum commune*, который ингибирует рост *Staphylococcus aureus*, но также и *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. Аналогичным действием обладают грибы рода *Ganoderma*. Антибактериальное действие установлено для грибов рода *Trametes*, способных образовывать антибиотик кориолин. *Agaricus compestis* образует компестин, подавляющий рост грамположительных и грамотрицательных

бактерий. Агариковые грибы, в частности *Agaricus xanthoderma*, содержит еще один антибиотик (псалиотин), выделенный из культуральной жидкости и активный против грамположительных бактерий.

Следует отметить, что уже к 60-м годам прошлого столетия значительно возрос интерес к полусинтетическим антибиотикам, которые получают путем химической модификации природных антибиотиков. К настоящему времени получено уже около 80 тысяч таких антибиотиков, большинство из которых активно применяется в медицине. Но с расширенным применением антибиотиков медики получили весьма серьезную проблему – устойчивость к этим препаратам, причем, как отмечает В.Г. Дебабов (2012), «это растущая нерешенная медицинская проблема». Еще одна проблема – снижение числа вновь открытых антибиотиков – за последние 40 лет введено только два новых класса антибиотиков: даптомицин и линезолил, которые не обладают активностью против грамотрицательных бактерий.

Высшие базидиомицеты содержат также вещества, активирующие гуморальный иммунитет, защищающий от вирусов и паразитических инфекций, включая и патогенные микроскопические грибы.

Известно, что в случае онкологических заболеваний и СПИДа люди умирают из-за иммунодисфункции. Поэтому чрезвычайно важно найти способы защиты таких больных от заболеваний, относящихся к микозам и бактериальным инфекциям. В настоящее время в качестве средств защиты используют лентинан из *L. edodes* и азидотимидин (АЗТ). Установлено, что лентинан и сульфатированный лентинан способны ингибировать репликацию вирусов и пролиферацию клеток.

Водорастворимый полифенол лигнан из мицелия *L. edodes* обнаруживает антивирусную активность. Такую же активность показывает и лентинан, например, против респираторных вирусных инфекций. Выделенная из *L. edodes* белковая фракция способна ингибировать развитие вируса табачной мозаики. Из базидиоспор *L. edodes* получен гликопротеин, обладающий выраженной активностью против вируса гриппа.

2.7. Токсические вещества высших грибов

Среди соединений грибов в последние годы особый интерес вызывают токсические вещества, которые условно можно разделить на токсикогенные и токсические вещества психотропного действия с галлюциногенным эффектом, причем большинство токсических веществ может в зависимости от концентрации обладать тем и другим действием одновременно. Интерес к токсикогенным веществам грибов обусловлен их медицинским применением и очень своеобразным действием на психику человека.

Токсикогенные вещества могут иметь различное химическое строение. Их продуцентами может быть мухомор красный, мухомор пантерный, некоторые виды волоконниц, говорушка белесоватая и другие. Токсическое и галлюциногенное действие оказывают мускарин и мускаридин. Смертельная доза мускарина содержится в 60–100 г волоконницы заостренной, 50–100 г говорушки красноватой ядовитой и 3–4 кг мухоморов красного и пантерного. Одурманивающее действие *Amanita muscaria* известно давно и использовалось служителями культа народов Восточной Европы и Сибири.

В народной медицине эти грибы издревле применялись при спазмах сосудов, эпилепсии, ангине, функциональных нарушениях деятельности спинного мозга, ревматизме. Интересно, что в Ведах (известных индийских эпосах) *A. muscaria* рассматривается как лучшее лекарство от всех болезней. В настоящее время установлено, что токсичность *A. muscaria* обусловлена наличием не только мускарина, но и иботеновой кислоты, муцимола, холина, атропина, скополамина.

В качестве сильного токсикогенного и лечебного средства используется *Amanita phalloides*. Этот гриб известен под названием «ангел смерти» и содержит два типа токсинов: медленно действующие аманитины и быстро действующие фаллотоксины. Суммарное содержание токсинов очень высокое – 0,7–1,2% от веса сухого плодового тела.

Amanita phalloides продуцирует 4 группы физиологически активных веществ:

Аматоксины – бициклические пептиды, являющиеся главной причиной смерти при отравлении, так как они ингибируют эукариотическую ядерную РНК-полимеразу;

Фаллотоксины – бициклические гептапептиды, действующие на актин плазматической мембраны клеток печени;

Фаллолизин – лектиноподобный пептид, лизирует гепатоциты, эритроциты и лейкоциты;

Антаманид – нетоксичный циклический декапептид, но его присутствие в плодовых телах не снижает токсического эффекта, связанного с действием аматоксинов.

В небольших концентрациях указанные выше токсины используются в гинекологии и при расстройствах центральной нервной системы. Интересно, что близкие виды – *A. citrina*, *A. pantherina*, *A. porphyria* – содержат не токсины, а биогенные амины – серотонин, буфотенин и другие производные индола.

Среди **галлюциногенов** (ГЦ) в 50–60 г. прошлого столетия интенсивно исследовались также производные 4-оксидиметилтриптамина, среди которых наиболее изучены псилоцибин (ПСБ) и псилоцин (ПСЦ). По своему действию большинство ГЦ относятся к антисеротониновым препаратам. Серотонин является нейромедиатором, а ПСБ и ПСЦ обладают высоким сродством к рецепторам серотонина в мозговых тканях и препятствуют переносу серотонина в нейронных синапсах. Эти препараты пытались использовать в психотерапии и психодиагностике. Список ГЦ грибов обширен, наиболее известные продуценты – грибы рода *Psilocybe*. Этот род насчитывает 144 вида, из которых 81 обладают ГЦ-действием.

Содержание ПСБ в различных грибах колеблется от 0,2 до 0,6% от веса сухого гриба. Наиболее высокая концентрация ПСБ – 0,6% – содержится в грибе *Psilocybe semperviva* Heim. ПСБ представляют собой белые кристаллы, растворимые в воде, но не растворяющиеся в органических растворителях. ПСБ представляет собой 4-оксидиметилтриптами́н, а ПСЦ – 4-гидрокси-оксидиметилтриптами́н. Действие ПСБ на психику человека подробно описано в 1964 г. врачом Г.В. Столяровым, который воспроизводил в своих исследованиях мексиканские рецепты о действии «священного мексиканского гриба». ПСБ вводят чаще

внутримышечно. При этом действие препарата выражено уже через 10–15 минут. В сфере восприятия отмечается большая яркость – цвета окружающих предметов становятся более сильно «окрашенными», появляются иллюзии и галлюцинации, наблюдается метаморфопсия, может происходить деперсонализация.

Наиболее существенно то, что ПСБ вызывает состояние эйфории и экстаза, и все проблемы перестают волновать человека. При этом дееспособность людей сохраняется, и они могут выполнять соответствующие приказы. В зависимости от стадии действия и концентрации ПСБ может вызывать болтливость, потерю контроля над собой. Таким образом, это психогенное вещество может использоваться не только как средство против нервных заболеваний, но и как своеобразный прессинг на психику человека.

В настоящее время в коллекциях депонированы культуры около двух десятков ГЦ-грибов родов *Psilocybe* и *Panaeolus*. Для получения плодовых тел этих грибов используются (при твердофазном культивировании) зерно, навоз, компост, мальт-агар; для плодоношения необходимы высокая влажность и хорошая аэрация. В последние годы как источники ПСБ и ПСЦ используют не только плодовые тела, но и мицелий, полученный в условиях глубинного культивирования. Установлено, что наиболее активный синтез ПСБ коррелирует с активным ростом мицелия (трофофаза) и низкой плотностью культуры.

2.8. Ароматические вещества грибов

В настоящее время базидиальные грибы рассматриваются и как потенциальные источники душистых веществ. Идентифицировано более 100 летучих метаболитов различной химической природы, многие из которых находят медицинское и парфюмерное применение. Кроме того, плодовые тела и мицелий *Lentinus*, *Marasmius* и *Pleurotus*, обладающие сильным специфическим ароматом, используются как ароматические добавки.

Для промышленного культивирования грибов отбираются штаммы, обладающие сильным грибным запахом: *A. bisporus*, *Coprinus compatus*, *P. ostreatus*, *Panus tigrinus*, *F. velutipes*, *Lepiota rhacodes*, *Lentinus edodes*, *Boletus edulus* и др.

Основное вещество, ответственное за грибной запах – оптически активный спирт 1-октен-3-ол. Из плодовых тел *L. edodes* получен в кристаллической форме предшественник другого вещества, составляющего грибной аромат (ГА) – лентиновая кислота. Установлена реакция, позволяющая получить из этой кислоты ароматоноситель лентионин. Кроме этих соединений ГА *L. edodes* составляют гуанозин-5-монофосфат (ГМФ) и, в меньшей степени, аденозин-5-монофосфат (АМФ). Следует отметить, что благодаря наличию этих соединений запах плодовых тел *L. edodes* отличается от традиционного ГА шампиньонов и белых грибов.

Летучие соединения высших грибов, кроме указанных выше, могут состоять из этилгексаноата, 3-метил-1-бутанола, этилацетата и этанола. Грибной запах, кроме 1-октен-3-ола, может зависеть и от этилгексаноата. Сочетание этих двух летучих соединений обуславливает наиболее стойкий ГА.

Летучие C₈-ароматические вещества грибов происходят из ненасыщенных жирных кислот, таких как линолевая и линоленовая. Первоначально происходит гидролиз липидов до свободных жирных кислот, их гидроперекисление липоксигеназами и расщепление до летучих алкоголей и альдегидов.

Для сохранения и усиления ГА был предложен ряд специальных технологий их культивирования. Еще в 1954 г. в патенте США для усиления ГА было предложено выращивать мицелий на среде с добавлением лецитиновой эмульсии или других съедобных жиров. Запах грибов можно усилить, если влажный мицелий отделить от питательной среды и смешать с NaCl, добавляемой в количестве 2–4%, далее необходимо выдержать мицелий при температуре 4 °С. Максимальное увеличение запаха зависит от возраста мицелия и проявляется более выражено на 7 – 8 сутки культивирования погруженного мицелия.

Другие условия культивирования, в частности интенсивность перемешивания мицелия, а также возраст мицелия являются одними из факторов, влияющих на синтез ароматических веществ. Так, *S. compatus* и *A. bisporus* первоначально синтезируют 1-октен-3-ол, после 7 суток роста начинается образование ГМФ, что связано с начинающимся автолизом мицелия и, хотя

ГА усиливается, одновременно происходит уменьшение выхода биомассы.

В последнее время биотехнологи обращают внимание на способность некоторых грибов синтезировать ароматические соединения, относящиеся к терпенам. Установлено, что *Ceratocystis fimbriata* штамм RWD 835 образует интересный спектр монотерпенов: линалоол, цитронеллол и гераниол; *Chaetomium globosum* синтезирует геозмин; *Ceratocystis coeruleascens* – синтезирует 6-метил-5-гептен-2-он, нерол; *Clitocybe illudens* синтезирует α -кадинол; ряд базидиомицетов способен выделять β -ионон. Эти соединения могут иметь значение как антисептические соединения при бактериальных и, возможно, вирусных простудных инфекциях.

2.9. Лекарственные препараты с антиканцерогенными и общеукрепляющими свойствами, выпускаемые в Японии и Китае

В Японии и Китае грибы широко используются в качестве препаратов с общеукрепляющей и противоопухолевой активностью.

С этой целью готовят:

- Порошки из цельных грибов;
- Кулинарные изделия (кексы, лепешки и т.д.) из грибного порошка с добавлением соевой, кукурузной и рисовой муки;
- Водные экстракты из определенных видов грибов – «грибной чай» – очень популярный напиток на Востоке, его пьют 3 раза в день;
- Алкогольные тонизирующие экстракты из грибов.

В качестве современных лекарственных препаратов используют:

- β -глюкан-белковый комплекс из *Coriolus versicolor* (β -1,6-; β -1,3-; β -1,4-глюканы);
- β -глюкан из *L. edodes* (β -1,6-, β -1,3-глюканы);
- β -глюкан из *Schizophillum commune* (β -1,6-, β -1,3-глюканы).

2.10. Ранозаживляющие препараты из мицелиальных грибов на основе аминополисахаридов (хитина и хитозана)

В 70-е гг. прошлого столетия хитин грибов привлек внимание медиков, так как в народной медицине грибы издревле использовались как ранозаживляющее средство. Грибной порошок до сих пор широко используется в Мексике и в странах Востока. Для этих целей применяют высшие грибы, относящиеся к Basidiomycetes (*Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *Hericium erinaceum*, *Poria cocos* и др.).

В последние годы в фармацевтической промышленности отмечается увеличение интереса к ранозаживляющим препаратам. Этот интерес обусловлен следующими причинами:

- 1) прогрессирующим ростом травм среди населения;
- 2) возможностью прогнозировать получение медицинских препаратов с определенными медико-биологическими свойствами, благодаря успехам в химии природных соединений и достижениям в области биотехнологии и микологии;
- 3) возможностью использовать при создании лекарств вместо продуктов химического синтеза природные биологически активные соединения, обладающие высокой регенерирующей способностью и отсутствием побочных эффектов.

Учитывая сказанное выше, а также данные о способности грибного мицелия оказывать ранозаживляющее действие, коллектив ученых – сотрудников ИНМИ РАН, Научно-практического центра термических поражений при Институте хирургии им. А.В. Вишневского РАМН – поставил в 1993 г. задачу разработать биотехнологию получения ранозаживляющего препарата с целевым назначением как противоожоговое лекарственное средство.

Важное значение в комплексном лечении обожженных имеет эффективная местная медикаментозная терапия. Применяемые в настоящее время средства для лечения ран могут обладать различными свойствами – обезболивающими, гемостатическими, активными, стимулирующими процессы регенерации, но могут быть и полифункциональными. Последние представляют собой наиболее ценные лекарственные средства.

Одним из таких средств является препарат «Микоран», разработанный коллективом ученых Института микробиологии РАН и Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН. Это лекарственное средство является природным препаратом, получаемым из мицелия низшего гриба *Blakeslea trispora*. «Микоран» представляет собой мелкодисперсный порошок желтого цвета. Основным началом его являются полисахариды (хитин и хитозан), что обеспечивает ранозаживляющую и сорбционную активность. В отличие от существующих зарубежных медицинских препаратов, в «Микоране» используется не хитин ракообразных, а хитин мицелиальных грибов. Это обстоятельство уже определяет доступность «Микорана», в том числе, в экономическом отношении. Из-за загрязнения окружающей среды, нарушения природных пищевых цепочек в результате массового отлова рыбы, уничтожения водорослей и зоопланктона – идет сокращение численности ракообразных. Кроме того, дефицит крабов, их высокая стоимость связаны с сезонностью отлова.

Этих недостатков лишены мицелиальные грибы, получаемые биотехнологическим способом в ферментерах. Такой способ получения сырья не зависит от сезонности, процесс занимает всего 3–4 дня; для приготовления питательных сред можно использовать дешевое сырье, например муку, древесные отходы. Существенно и то, что получаемый из такого сырья хитин не содержит тяжелые металлы, фенолы, радионуклиды, т.е. те примеси, которые делают в некоторых случаях хитин крабов непригодным для использования в медицине.

Проведенные токсикологические исследования показали, что «Микоран» не обладает мутагенными, эмбриотоксическими, тератогенными и алергизирующими свойствами. Препарат не обладает ДНК-повреждающим действием, что свидетельствует об отсутствии потенциальной канцерогенной опасности. В первые 4–6 суток после применения препарата наблюдается активное очищение раны от фибрина. Динамическое исследование раневых отпечатков также свидетельствовало об очищении ран по мере применения «Микорана».

Использование препарата «Микоран» на гранулирующих ранах после глубоких ожогов приводило к уменьшению фи-

бринозно-гнойного отделяемого, способствовало уменьшению отечности грануляций. Параллельно происходило снижение уровня микробной обсемененности. Выполнение в этих условиях свободной аутодермопластики во всех случаях заканчивалось хорошим приживлением кожных лоскутов.

Таким образом, препарат «Микоран» является эффективным средством для местного лечения ран. Его применение способствует снижению бактериальной обсемененности, что связано с хорошим дренированием раневого отделяемого за счет выраженного сорбционного эффекта, а также ускоряет регенерацию. «Микоран» прост и удобен в обращении. Побочных эффектов при его использовании не наблюдалось. В настоящее время «Микоран» прошел клинические испытания, лицензирование и решением Минздрава РФ разрешен к применению на территории РФ как противоожоговый и ранозаживляющий препарат.

Ранозаживляющее действие мицелия мукоровых грибов, в частности, *Phycomyces blakesleanus*, было подтверждено и в более поздних исследованиях. Благоприятный эффект мицелия мукоровых грибов на заживление ран также объясняли его способностью стимулировать пролиферацию фибробластов, причем предполагалось, что в целях экономии на раны можно накладывать стерильный, лиофильно высушенный мицелий, не выделяя полиаминосахариды. Предполагалось также, что использование полисахаридов из грибов не только решает проблему быстрого заживления ран, но и обеспечивает защиту от инфицирования, в частности, от *Pseudomonas aeruginosa* – наиболее опасного микроорганизма.

Механизм ранозаживляющего действия полиаминосахаридов пока неясен, но интенсивно исследуется. Показано, что хитин, имплантированный в бычье сухожилие, индуцирует образование коллагена и эластиновых волокон. В последнее время появились данные, позволяющие с новых позиций оценить биологическую активность полиаминосахаридов из грибов. Установлено, что олигосахаридные фрагменты, образующиеся при ферментативном гидролизе хитина и хитозана, являются сигнальными молекулами, включающими механизмы синтеза ряда защитных соединений у растений, в частности фитоалек-

синов, которые способствуют заживлению повреждений, регуляции роста и морфогенеза у растений. Вероятно, определенную роль в реакциях заживления может играть и открытый недавно новый тип углеводов-углеводного взаимодействия и, в частности, участие в этом взаимодействии, кроме гликолипидов и гликопротеинов, третьего класса гликоконъюгатов – полисахаридов. Можно предположить, что в этом типе «узнавания» участвуют не только молекулы $\beta(1-3)$ -глюкана, в которых углеводные эпиптопы тесно расположены и многократно повторяются, образуя поверхность, принципиально похожую на углеводный «ковёр» из мембранных гликолипидов, но и хитиновые цепи. В связи с этим интересны данные о том, что хитин и его производные, как и глюканы, стимулируют активность макрофагов – клеток, участвующих в процессах заживления раневых поверхностей.

Из хитина высших грибов (Basidiomycetes) украинские ученые получают препарат Микотон, содержащий 70% хитина, 20% разветвленных α - и β -глюканов и 10% меланина. Этот препарат имеет гастрорэнтерологическую направленность и оказывает заживляющее действие на желудочно-кишечный тракт. Ряд японских фирм, специализирующихся в косметической промышленности, предлагают использовать грибной хитин и глюканы для создания средств ухода за волосами.

В заключение следует отметить, что ранозаживляющие препараты на основе хитозана крабов выпускаются фирмой «Unitika» (Япония). Из хитина крабов получают искусственную кожу (Beschitin-W), которую рекомендуют использовать при ожоговых ранах. Однако эти препараты малодоступны из-за высокой стоимости. В этом отношении биотехнологии получения аналогичных противоожоговых препаратов на основе полиаминосахаридов грибов обладают явными преимуществами: более низкой стоимостью, неограниченностью сырьевых ресурсов, более высокой ранозаживляющей способностью, отсутствием в процессе химической очистки агрессивных соединений, экологически чистыми технологиями.

2.11. Использование трегалозы в медицине и пищевой промышленности

В одном из научных обзоров по получению и использованию трегалозы о ее роли сказано, что «Природа создала этот сахар для сохранения жизни». Действительно, практическое использование трегалозы подтверждает сказанное выше. Наиболее широко трегалоза используется при хранении вакцин в условиях комнатных температур, предохранении ферментов от разрушения и для защиты клеток млекопитающих от повреждений при низкотемпературной сушке. В настоящее время трегалоза применяется в косметике как стабилизатор липосом и в пищевой промышленности как стабилизатор при внесении подсластителей.

В последнем процессе роль трегалозы особенно важна, так как она не вступает в химические реакции с аминокислотами и белками, как другие сахара. Поэтому ее использование не приводит к появлению коричневой окраски при нагревании. Объясняется это особенностями ее химической структуры, что делает трегалозу наиболее химически инертным углеводом; ее высокая стабильность обусловлена очень низкой энергией (1 ккал/моль) благодаря наличию атома кислорода в гликозидной связи, соединяющей два гексозных кольца.

Трегалозу получают путем экстракции из биомассы дрожжей, содержащих около 20% этого дисахарида. Процесс ферментации и условия хранения дрожжей был досконально доработан еще в конце XX столетия рижскими учеными. Было показано, что клетки дрожжей с высоким содержанием трегалозы (10–16 %) хорошо сохраняют жизнеспособность во время длительного хранения.

В настоящее время более передовым считается новый метод получения трегалозы – ферментативная биотрансформация, в основе которой лежат три основные ферментативные пути синтеза трегалозы: фосфорилазная система, обнаруженная у мицелиальных грибов и дрожжей, гликозилтрансферазно-гидролазная система, свойственная мезофильным бактериям – *Arthrobacter* sp., и синтез трегалозы из мальтозы, катализируемый интрамолекулярным трансгликозилированием (*Thermus* spp.).

В 1990 г. стоимость 1 кг трегалозы составляла почти 700\$ США, в настоящее время стоимость этого дисахарида значительно снизилась, благодаря новым технологиям.

В последнее время трегалоза нашла применение не только в косметике и в медицине как адаптоген при пересечении часовых поясов, но и в пищевой индустрии. Основанием к этому послужило установление того факта, что в зависимости от концентрации меняется эффект действия трегалозы на мицелиальные грибы. В исследованиях с мицелиальными грибами, заражающими пищевые продукты на предприятиях АПК, было показано, что действие консерванта – сорбата калия (СК) – не является длительным. Наблюдается его разрушение ферментами грибов аскомицетного аффинитета, и начинается рост вторичного мицелия, причем более интенсивный, чем в контроле.

Однако, если вместе с СК в среду выращивания внесено 0,1% трегалозы, то рост гриба задерживается до 7 суток. Если же вместе с консервантом внесено значительно большее (в 10 раз) содержание трегалозы – 1%, то в этом случае СК действует как консервант значительно меньшее время, и уже на 7 сутки биомасса гриба составляет половину от контрольной, а в дальнейшем наблюдается усиление ростовых процессов.

Таким образом, установлены два новых факта, касающиеся необычного действия трегалозы: этот дисахарид выступает в роли соединения, под действием которого не проявляется эффект консерванта и происходит стимуляция роста грибов. Однако эта необычная функция трегалозы определяется ее достаточно высоким содержанием в среде культивирования (более 1%). Если же концентрация этого полисахарида в 10 раз меньше, то трегалоза выступает уже в роли ингибитора ростовых процессов, т.е. в известной уже функции природного консерванта при действии стрессорного фактора. В связи с этим интересно наблюдение, что ни глюкоза, ни лактоза не оказывают подобного действия. Эти данные открывают новые возможности в области консервации пищевых изделий и позволяют не применять антибиотики и другие небезопасные для здоровья людей консерванты.

Литература

- Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Киев: Наукова Думка, 1988. 202 с.
- Буренин И.С., Полянская Н.И., Кузмина З.В., Андриевский Г.В., Помогайбо С.В. Синтетические пептиды как основа для создания лекарственных препаратов нового поколения // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т. 3. №2. С. 15.
- Дебабов В.Г. Устойчивость к антибиотикам: происхождение, механизмы, подходы к преодолению // Биотехнология. 2012. № 4. С. 7–17.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
- Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Ванштейн М.Б. Биосинтез арахидоновой кислоты микромицетами // Прикл. биохимия и микробиология 2011. Т. 47. № 2. С. 125–134.
- Ефременкова О.В., Тихонова О.В., Толстихина Т.Е., Васильев Б.Ф., Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В., Штаер О.В., Поединок Н.Л., Бисько Н.А., Михайлова О.Б. Определение антимикробной активности природных штаммов базидиомицетов в условиях глубинного культивирования // Современная микология в России. 3 съезд микологов России. 2012. С. 406–407.
- Ефременкова О.В., Васильев Б.Ф., Тихонов О.В., Королев А.М., Резникова М.И., Лузиков Ю.Н., Преображенская М.Н., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Мирчинк Е.П., Дьяков М.Ю., Биланенко Е.Н., Качалкин А.В., Камзолкина О.В. Природный изолят аскомицетного гриба *Xylaria acuta* – продуцент антибиотического комплекса // Современная микология в России. 3 съезд микологов России. 2012.
- Колот Ф.Б., Вакулова Л.А., Веселов И.Я., Самохвалов Г.И. Биосинтез каротиноидов грибами // Усп. совр. биол. 1971. Т. 71. С. 18–42.
- Конова И.В. Использование микромицетов как продуцентов ценных липидных препаратов и утилизаторов органических загрязнителей окружающей среды // Москва и Наука. Ботаники и микробиологи для Москвы и москвичей / М.: Московский Комитет по науке и технологиям, 1997. № 27. С. 7–78.
- Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Состав ацилсодержащих липидов клеточных фракций гриба *Mucor lusitanicus* в условиях различного режима азотного питания // Микробиология. 1994. Т. 63. № 4. С. 624–629.

- Смирнова И.О., Буренин И.С., Валуева И.М., Кривошеев О.Г., Полянская Н.И. Лечение гиперплазии предстательной железы крыс отечественным аналогом люлиберина // Эксперим. исслед. 2001. С. 14–16.
- Торланова Б.О., Конова И.В., Фунтикова Н.С., Бабанова Н.К., Катомина А.А., Мысякина И.С. Влияние условий культивирования муковорого гриба, обработки биомассы, способа экстракции на получение липидов, содержащих γ -линоленовую кислоту и каротиноиды // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 4. С. 614–622.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Вакулова Л.А., Шашкина М.Я. Способ получения биологически активного средства. Патент РФ № 2166868. 2001.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Дулькин Л.М., Гончаров Н.Г. Ликопин грибов: биотехнология получения и перспективы использования в медицине // Микробиология. 2006. Т. 75. № 6. С. 725–730.
- Феофилова Е.П. Трегалоза, стресс и анабиоз // Миробиология. 1992. Т. 61. Вып. 5. С. 741–755.
- Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Алексеев А.А., Евтушенков В.П., Ивановский А.Г. Новая отрасль биотехнологии – ранозаживляющие препараты на основе аминополисахаридов // Микробиология. 1999. Т. 68. № 6. С. 834–837.
- Фунтикова Н.С., Катомина А.А., Мысякина И.С. Способ получения липидов, содержащих γ -линоленовую кислоту. Патент РФ № 1751212. 1992.
- Bentley R. Different routs of discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence beta-lactams) // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. P. 775–786.
- Coates A.R.M., Halls G., Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? // Br. J. Pharmacol. 2011. V. 163. P. 164–184.
- Horrobin D.F. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema // Am. J. Clin. Nutr. 2000. V. 71. P. 367S–372S.
- Iwanashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Cell. Mol. Biol. 1995. V. 41. P. 763–769.
- Johnson C.D., Puntis M., Davidson N., Todd S., Bryce R. Randomized, dose-finding phase III study of lithium gamolenate in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma // Br. J. Surg. 2001. V. 88. P. 662–668.

- Kenny F.S., Pinder S.E., Ellis I.O., Gee J.M., Nicholson R.I., Bryce R.P., Robertson J.F. Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer // *Int. J. Cancer*. 2000. V. 85. P. 643–648.
- Mizuno T., Kinoshito T., Zhuang C., Ito H., Mayuzumi Y. Antitumor-active heteroglycans from Niohshimeji mushrooms *Tricholoma giganteum* // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995. V. 59. P. 568–571.
- Oku K., Watanabe H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., Komori M., Inoue Y., Sakurai M. NMR and quantum chemical study on the OH... π and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 42. P. 12739–12748.
- Whitehouse P.A., Cooper A.J., Johnson C.D. Synergistic activity of gamma-linolenic acid and cytotoxic drugs against pancreatic adenocarcinoma cell lines // *Pancreatology*. 2003. V. 3. P. 367–373.

Заключение

Перспективы развития и будущее фармакологической микологии

Еще в начале прошлого столетия грибы интересовали человечество в основном как вкусная и здоровая пища. В настоящее время грибы все больше влияют на человеческий социум, так как много внимания приходится уделять возрастающей отрицательной деятельности этих низших эукариотов (порча продуктов питания, разрушение материальных ценностей, особенно в последние годы страдают бумажные и тканевые изделия). Растет число микозов, особенно оппортунистических, и появляется все большее число видов грибов, способных вызывать эти заболевания.

Наряду с этим, новое направление в медицине – получение из грибов лекарственных препаратов – стало в последние годы одним из передовых направлений современной медицины. В настоящее время мицелиальные грибы рассматривают не только с позиций их пищевой ценности, но и как источники для получения БАВ, которые можно использовать как иммуностимуляторы, адаптогены, антиканцерогены, как вещества, поддерживающие состояние гомеостаза, регуляторы биоритмов сердечной деятельности. Грибы оказывают также гиполипидемический, антисклеротический, тромболитический, гипотензивный и антибиотический эффекты.

Такая особенность грибов, как гетерогенность их физиолого-биохимических свойств, оказалась очень удобной для биотехнологов, так как из этих организмов стало возможным получать биологически активные вещества, продуцентами которых ранее были животные, растения и бактерии. Например, такие гормоны

растений, как гиббереллины, абсцизин, фузикококцин теперь получают из грибов *Fusarium moniliforme*, *Fusicoccum amygdale* Del. и других. Ликопин, который ранее получали из томатов, теперь получают из мукорового гриба *Blakeslea trispora*. Этот же гриб может быть продуцентом при получении биотехнологическим способом β -каротина и убихинона.

В последнее десятилетие грибы рассматривают как выгодные источники получения эссенциальных жирных кислот – линолевой и линоленовой, а также арахидоновой и эйкозапентаеновой. Эти свойства грибов, а также их способность наращивать при глубинном культивировании достаточно большие объемы биомассы за сравнительно короткие сроки ферментации, возможность использовать недефицитные, сравнительно дешевые среды для культивирования, например отходы других производств, получать в течение одной ферментации несколько конечных продуктов, неограниченность производства, возможность его масштабирования, экологическая чистота – способствовали тому, что именно грибы, как наиболее используемые продуценты в ряде биотехнологических производств, заняли одно из первых мест.

В свою очередь, развитию таких биотехнологий способствовали данные о том, что грибы могут служить источниками для получения ценных медицинских препаратов. Эта отрасль биотехнологии заняла в медицине к концу XX века такую прочную позицию, что выделилась в отдельную дисциплину, называемую фармацевтической микологией. Созданию этой отрасли медицинской индустрии способствовали также значительные успехи в изучении химии природных соединений грибов и установление связи между химической структурой определенных БАВ и их медицинским использованием. Появилась даже возможность «конструировать» препараты с определенными медицинскими свойствами в зависимости от химической формулы активного начала, например, с регенерирующей активностью, тромболитическим действием, антибактериальной активностью в отношении патогенной микрофлоры и др.

В последние годы микологи, химики природных соединений, медики и биотехнологи, которые теперь совместно создают

новые медицинские препараты, обратили особое внимание на иммуномодулирующую активность лекарственных средств, получаемых из грибов. Согласно современным данным, иммуномодуляторами считают любые вещества, которые оказывают стимулирующее, супрессирующее или регуляторное воздействие на иммунную систему, а иммунный ответ организма направлен на поддержание генетического постоянства его внутренней среды (его гомеостаза). Лекарственные вещества могут оказывать как специфический, так и неспецифический иммуномодулирующий эффект, и в этом отношении в последнее время особый интерес вызывают мицелиальные грибы, особенно Basidiomycetes, которые с давних пор используются в традиционной восточной медицине как лекарственные средства.

Уже в I веке нашей эры римский ученый Диоскорид отметил лечебные свойства листовичного трутовика. Вытяжки из этого гриба помогали при некоторых желудочно-кишечных заболеваниях. Наиболее достоверные сведения о лечебном действии грибов появились уже более 3000 лет назад, и такими грибами являются *Fomes fomentarius*, *Calvaria (Langermannia) gigantea*, *Lariciformes officinalis*, *Amanita muscaria*, *Claviceps purpurea*, *Tuber* sp., *Morchella esculenta* и др. В прошлом веке в народной медицине среди грибов наибольшей популярностью пользовались *Inonotus obliquus* и *Piptoporus betulinus*, которые применяли как ранозаживляющие и противоопухолевые средства.

Позднее предположили, что эти грибы обладают и достаточно выраженной иммуномодулирующей активностью. В XX веке интерес стали вызывать другие грибы, тоже оказывающие благоприятные лечебные эффекты. Это *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma* sp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes* и др. Но уже в это время медицинское использование этих грибов осуществлялось параллельно с установлением связи между лечебным эффектом и химическим строением активного начала лекарства, поэтому при изложении данных о лекарственных препаратах из грибов мы считали целесообразным следовать указанной выше взаимосвязи.

Исследования лечебных свойств базидиомицетов показали, что наиболее значимые результаты получены с полисахаридами,

оказывающими иммуномодулирующую и противоопухолевую активности. Среди всех биологических молекул именно полисахариды имеют наибольшую способность к передаче информации, так как олигосахариды и полисахариды способны к многочисленным интерконверсиям за счет разветвленной и линейной структуры. Эта громадная потенциальная вариабельность обеспечивает функционирование очень точных регуляторных механизмов в процессах клеточных взаимодействий.

В последние годы появились работы по созданию препаратов из грибов, обладающих выраженной антивирусной активностью. Известно, что в состав гриба чаги (*Inonotus obliquus*) входит сложный полифенолкарбонный комплекс, включающий также меланины и гуминовые кислоты, который представляет интерес в качестве создания перспективных профилактических и лекарственных средств против ВИЧ-возбудителя. Показано, что водные экстракты из чаги обнаруживают также противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса 2 типа (Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН – Т.В. Теплякова, Н.В. Псурцева, Т.А. Косогова).

Получены новые данные о гепатопротекторном действии грибов. ООО «Гелла-Фарма» в 2005 г. завершила разработку биотехнологии по получению нового лекарственного средства из экстракта гриба *Fusarium sambucinum*, обладающего гепатопротекторным действием.

Механизм лечебного эффекта биологически активных веществ грибов мало известен. Но предполагают, что полисахариды, полисахарид-белковые комплексы и другие БАВ грибов обладают не «точечным» действием, а способностью активировать иммунную систему, увеличивая, таким образом, потенциал защитной активности организма. Вещества грибов рассматривают как мультицитокининовые индукторы, вызывающие экспрессию генов многих цитокининов.

В то же время многие БАВ грибов являются антиоксидантами, перехватчиками свободных радикалов. Следует отметить и тот факт, что лекарственные препараты, полученные из грибов, в

частности, антиканцерогенные и иммуномодулирующие, имеют более низкую стоимость, чем их аналоги, синтезированные химическим способом. Кроме того, БАВ грибов не оказывают токсического действия, которое отмечается при прохождении курса антираковой терапии.

Следовательно, «красная» биотехнология грибов представляет собой чрезвычайно перспективное направление, но успехи в расширении базы лекарственных перпаратов из грибов четко связаны с определенными условиями: поисками новых видов грибов, изучением их физиологии и биохимии, развитием сети селекционных лабораторий, тесно связанных с производством, проведением до- и клинических испытаний, т.е. требует квалифицированных микологов, генетиков, биотехнологов, медиков и достаточно больших финансовых вложений.

Интересно, что сбываются пресказания наиболее известного английского журнала «The Lancet», который еще в 1925 г. писал о том, что медицинские свойства грибов представляют собой неиссякаемый источник для новых терапевтических исследований.

ФЕОФИЛОВА

Елена Петровна

АЛЕХИН

Александр Иванович

ГОНЧАРОВ

Николай Гаврилович

МЫСЯКИНА

Ирина Сергеевна

СЕРГЕЕВА

Яна Эдуардовна

**Фундаментальные основы микологии
и создание лекарственных препаратов
из мицелиальных грибов**

Подписано к печати 15.08.2013 г.

Формат 60х90/16.

Гарнитура «Constantia».

Объем 9,5 п.л. Тираж 1000 экз.

Издатель: Национальная академия микологии

Компьютерная подготовка ООО «ТАСТ»

Отпечатано на полиграфической базе

ООО «ТАСТ»