

СУПРУН С.М.<sup>1</sup>, ДОНЧЕНКО Г.В.<sup>1</sup>, ПАРХОМЕНКО Ю.М.<sup>1</sup>, ХАРКЕВИЧ Е.С.<sup>2</sup>,  
СТЕПАНЕНКО С.П.<sup>1</sup>, ЛЯСОТА В.П.<sup>3</sup>, СИДНИЧЕНКО И.В.<sup>3</sup>, КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины

Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 154

<sup>3</sup> Белоцерковский национальный аграрный университет

Украина, 09117, Белая Церковь, Киевская обл., Соборная пл., 8/1

## ВИТАМИННО-ПРОТЕИНОВЫЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ: ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ

В настоящее время микромицеты используются в различных отраслях народного хозяйства – защите окружающей среды, сельском хозяйстве, медицине. Они содержат природный комплекс биологически активных соединений. Более того, белок, который входит в состав грибов, по своему аминокислотному составу не уступает животному. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон, что является основанием их использования для получения пищевых и кормовых до-

бавок. Микромицеты давно и успешно используются в биотехнологии для получения таких биологически активных соединений как липиды, пищевые волокна, ферменты, антибиотики, а также других фармакологических препаратов [1–3].

Цель исследований: разработка получения витаминно-протеинового препарата на основе селекционированных штаммов продуцентов витаминов, коферментов и белка и его испытания на животных.

### Материалы и методы

Работа проводилась на основе селекционированных нами штаммов *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 – продуцент комплекса биологически активных веществ, с преобладанием никотиновой кислоты и ее производных, *Fusarium sambucinum* ВКПМ F-139 – продуцент пантотеновой кислоты и кофермента А, *Mycelia sterilia*-ИМВ F 10014 - целлюлозолитических ферментов и белка, *Penicillium sclerotiorum* – β-каротина. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1 % по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал (инокулят) готовили в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах или в производственных условиях с использованием ферментера емкостью 1,2 м<sup>3</sup> в ПП БТУ-Центре г. Ладыйжин. Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм в течение 30 мин и засеивали 5 %-ным инокулятом. В производственных условиях культивирования получали порошкообразную форму препарата на основе штаммов *Fusarium sambucinum*. Определение витаминов и других биологически активных веществ проводили согласно методам [4, 5], аминокислоты определяли на аминокислотном

анализаторе ААА–339 (Чехия). Разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) растворяли в гексане и хроматографировали на хроматографе HRGC 5300 (Италия) на стеклянной набивной колонке длиной 3,5 м, заполненной Chromosorb W/HP с нанесенной 10 % жидкой фазой Silar 5CP при программированной температуре 140–250<sup>0</sup>С с нарастанием 2<sup>0</sup> в мин. Идентификацию, индивидуальных жирных кислот проводили с помощью стандартов фирмы «Sigma» и «Serva». Содержание индивидуальных жирных кислот выражали в процентах от общей суммы [6].

Витаминно-протеиновый препарат был протестирован на животных: перепелах и мышах. Опыты по доклиническому испытанию препарата проводили на перепелах и мышах. В опытные группы с перепелами (по 20 в каждой) к основному рациону прибавляли витаминно-протеиновую добавку в дозе 2,0 г/гол., 4,0 г/гол. или 6,0 г/гол. Длительность эксперимента составляла 60 дней, контрольную группу содержали на основном полноценном рационе. В серии опытов с мышами (по 5 особей в каждой группе) длительность экспериментов также составляла 60 суток. Животные, содержащиеся на стационарном рационе вивария, получали биопрепарат

в комплексе с основным рационом. Контролем служили мыши, которые содержались на стандартном рационе вивария.

Для оценки влияния витаминно-протеинового препарата использовали такие критерии: поведенческие реакции животных, выживаемость, показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, лейко-

### Результаты и обсуждение

Нами в результате проведения поэтапной селекции были получены штаммы продуценты витаминов, коферментов и белка. Изучены физиолого-биохимические свойства штаммов, что дало возможность подобрать штаммы для совместного культивирования. Среди них: *Fusarium sambucinum F-139* – продуцирует пантотеновую кислоту и кофермент А, *Fusarium sambucinum ИМВ F-10011* – активный продуцент комплекса витаминов, и в значительном количестве синтезирует никотиновую кислоту (1250-1400 мкг/г) и ее коферментные формы, и *Mycelia sterilia ИМВ-F 10014* целлюлозолитические ферменты и белок. Штаммы являются мезофилами и отличаются по оптимальным температурам роста, так оптимум роста *Fusarium sambucinum* составляет 24–26 °С, а при 37°С отмечено отсутствие роста. Для штамма *Mycelia sterilia* оптимальный рост наблюдался при температуре 28–30 °С. В лаг-фазе у *Fusarium sambucinum* отмечен наиболее высокий прирост биомассы, удельная скорость роста *Fusarium sambucinum-F-10011* – 0,34 ч<sup>-1</sup>, *Fusarium sambucinum F-139* – 0,28 ч<sup>-1</sup>, в то время как у *Mycelia sterilia* она составляла 0,13 ч<sup>-1</sup>. Для совместного культивирования подобраны штаммы *Fusarium sambucinum ИМВ F-10011* и *Mycelia sterilia ИМВ-F 10014*, а также штаммы *Fusarium sambucinum*. При их совместном культивировании наблюдали значительное повышение со-

дигарная формула, свертываемость крови) и биохимические тесты: уровень белка, ферментов в сыворотке крови и отдельных ее фракциях, морфоструктура внутренних органов. Определение выше указанных показателей проводили общепринятыми методами согласно ветеринарным требованиям к доклиническим испытаниям [7].

держания имеющихся в них витаминов, а также сокращение сроков ферментации до 42 часов. При раздельном культивировании штаммов по общему выходу протеина (сумма аминокислот) преимущества имеет штамм *Fusarium sambucinum F-10011* в его биомассе содержится 305,7 мг на 1 г с.б., а в биомассе *Fusarium sambucinum F-139* – 276,8 мг на 1 г с.б., в то время как в биомассе *Mycelia sterilia* – 165,5 мг на 1 г с.б. Из незаменимых аминокислот мицелия штаммов *Fusarium sambucinum*, в значительном количестве содержится лизин, триптофан, лейцин, а у штамма *Mycelia sterilia* преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

В штамме *Fusarium sambucinum* инденцифицировано 26 жирных кислот. Среди насыщенных жирных кислот преобладает пальмитиновая, а среди ненасыщенных жирных кислот – олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой, содержание которых у данного штамма составляет 70 %, преобладает линолевая кислота. Особенно ценно наличие арахидоновой кислоты, которая является предшественником простагландинов в организме животных и человека и входит в состав структурных элементов мембран (табл. 1). Такое высокое содержание ненасыщенных жирных кислот отмечено в плодовых телах некоторых высших базидиальных грибов [8].

Таблица 1. Жирнокислотный состав липидной фракции микромицетов (% от общей суммы)

Кислота	<i>Fusarium sambucinum F-100</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Fusarium sambucinum F-139</i>
C16:0( пальмитиновая)	14,02	22,55	16,45
C18:0 (стеариновая)	3,95	2,55	3,22
C16:1(пальмитолеиновая)	1,02	1,55	1,14
C18:1(олеиновая)	23,09	7,17	27,98
C18:2(линолевая)	46,17	49,44	40,60
C18:3(линоленовая)	6,90	4,47	5,65
C20:4(арахидоновая)	1,08	6,19	1,80

Штаммы *F. sambucinum* по своим физиолого-биохимическим показателям, аминокис-

лотному составу, содержанию витаминов и жирных кислот являются перспективными для

использования в биотехнологии для получения отдельных витаминов, а также комплексов жирных кислот, пищевых и кормовых добавок, косметических средств. Показано, что выход определенных витаминов и коферментов при ферментации может быть повышен за счет добавления в инкубационную среду предшественников их биосинтеза. Полученные данные представляют интерес при постановке задачи разработки биотехнологии получения отдельных витаминов или коферментов.

Нами в производственных условиях в ПП БТУ – Центре г. Ладыжин была наработана партия грибного препарата на основе штаммов *F. sambucinum* и передана для проведения доклинических испытаний в Белоцерковский национальный аграрный университет. Витаминно-протеиновый препарат представляет собой комплекс природных биологически активных соединений (витаминов, коферментов, незаме-

мых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество витаминов, в том числе, никотиновую кислоту и ее производные, в частности  $NAD^+$  (6,0 мг/г а.с.в.), тиамин, витамин Е и витамин  $B_{12}$ .

Тестирование на животных: мышах и перепелах показало, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, корм они поедали полностью, водопотребление было обычным. Выживаемость животных в подопытных группах составила 100 %, прирост массы тела на 60 день составлял 10,3 %, а прирост биомассы перепелов – 10,5 %. В результаты исследований морфологических показателей крови установлены активация эритропоеза и увеличение уровня гемоглобина на 6,2 %. Количество эритроцитов и лейкоцитов у подопытных перепелов и мышей находилось в пределах физиологических норм (табл. 2).

Таблица 2. Влияние витаминно-протеиновой добавки на морфологические показатели крови перепелов через 60 дней кормления ( $M \pm m$ ,  $n = 20$ )

№ п/п	Показатель, ед. измерения	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Контроль
1	Гемоглобин, Г/л	135,19±3,17	137,18±4,32	131,5±3,56	129,13±4,68
2	Эритроциты, Т/л	3,49±0,38	3,51±0,45	3,45±0,33	3,39±0,31
3	Лейкоциты, Г/л	26,07±0,58	28,62±0,65	25,61±0,60	25,08±0,70
4	Тромбоциты, Г/л	127,3±4,01	128,2±3,64	124,6±3,40	123,1±3,51

Что касается свертывающей способности крови, то она не претерпевала изменений. Изучение биохимических показателей сыворотки крови показало, что препарат повышает содержание общего белка на 2,4 %. В то же время, различий в концентрации глюкозы, общих липидов, холестерина, активности трансаминаз и

щело-чной фосфатазы не установлено. Белково-витаминная добавка повышала бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови. Показано, что витаминно-протеиновая добавка положительно влияет на яценоскость, а также увеличивается количество витаминов А и  $B_2$  в яйцах перепелов (табл. 3).

Таблица 3. Содержание витаминов А и  $B_2$  в яйцах перепелов через 60 дней кормления ( $M \pm m$ ,  $n = 20$ )

Группа	Содержание витаминов, мг/%	
	Вітамін А	Вітамін $B_2$
Опыт1	0,52 ± 0,05	0,97 ± 0,01
Опыт2	0,50 ± 0,03	1,14 ± 0,02
Опыт 3	0,49 ± 0,01	0,93 ± 0,01
Контроль	0,47 ± 0,01	0,73 ± 0,01

### Выводы

Разработанная биотехнология получения витаминно-протеинового продукта на основе совместного культивирования селекционированных штаммов – продуцентов белка, витами-

нов позволила сократить сроки ферментации и увеличить количество витаминов в конечном продукте. Витаминно-протеиновый продукт представляет собой природный комплекс биоло-

гически активных соединений, с высоким содержанием витаминов, незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот. Результаты доклинического испытания грибного препарата показали положительное влияние его не только на прирост живой биомассы теплокровных животных, но, что очень важно, повышение бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, что и способствовало повышению выжи-

ваемости молодых особей. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения витаминно-протеинового продукта для повышения производственных показателей и природной резистенции сельскохозяйственных животных, а также для получения на основе грибов-продуцентов отдельных витаминов а также лекарственных средств.

### Литература

1. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press.. – Santa Cruz, С.А., 1995. – 251 p.
2. Беккер З.Е. Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 260 с.
3. Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П. Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Vol. 32, № 5. – С. 483–492.
4. Экспериментальная витаминология: под редакцией члена-корр. АН БССР, доктора мед. наук Островского Ю.М. – Минск: Наука и техника, 1979. – 546 с.
5. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. – К.: Наукова думка, 1982. – С. 261–268.
6. Байдалинова Л.С., Кривич В.С., Бахлодина Л.П., Методические рекомендации и указания по газовой хроматографии жирных кислот. Калининград, 1977. – 33 с.
7. Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. – Л.: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
8. Горошина Е.С., Скворцова М.М., Высоцкий В.Г. Биотехнологический препарат лекарственного гриба кориола опушенного. Современная микология в России. Первый съезд микологов России. Тезисы докладов. Изд-во Национальной Академии микологии. – М., 2002.

**SUPRUN S.M.**<sup>1</sup>, **DONCHENKO G.V.**<sup>1</sup>, **PARKHOMENKO J.M.**<sup>1</sup>, **STEPANENKO S.P.**<sup>1</sup>, **KHARKEVICH E.S.**<sup>2</sup>, **SIDNICHENKO I.V.**<sup>3</sup>, **LASOTA V.P.**<sup>3</sup>, **KUCHMEROVSKA T.M.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine  
Ukraine, Kyiv, e-mail: sst@biochem.kiev.ua*

<sup>2</sup> *D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU  
Ukraine, Kiev*

<sup>3</sup> *Belotserkovskyy national agrarian university  
Ukraine, 09117, Kiev region Belaya Tserkov, pl. Sobornaya, 8/1*

### VITAMIN-PROTEIN PRODUCT BASED ON SELECTED STRAINS OF FUNGI: CHARACTERISTIC AND APPLICATION

**Aim.** Morphological, physiological and biochemical properties of select strain mycelial fungi-producing protein, vitamins, co-enzymes were studied. **Results.** It was established that strains of *Fusarium sambucinum* F-10011F F-139 have a high growth rate of 0,28–0,34 hour<sup>-1</sup>, rich in essential amino acids, unsaturated fatty acids such as oleic, linoleic, linolenic and arachidonic. Especially valuable presence in fungi arachidonic acid, which is a precursor of prostaglandins in the body of animals and human, was found. The biotechnology of biopreparation based on physiology-biochemical properties was developed using joint cultivation of *Fusarium sambucinum* selected strains. This approach allowed reduce the terms of fermentation and increase the output of biologically active substances. The preparation includes high content of vitamins, unsaturated fatty acids and other biologically active substances. The results of preclinical testing of fungal product have revealed a positive impact not only the growth of living biomass of warm-blooded animals, but also an increase antibacterial and lysosome activities of blood serum that led to increase of juveniles survival. **Conclusions.** Findings suggest the possibility to apply the developed vitamin-protein product for improvement enterprise performance and the natural resistance movement of farm animals for preparation fungal-producing drugs.

**Keywords:** biotechnology, vitamins, protein, food and feed additives.