

разработаны методы выделения комплексов флавоноидов из отобранных видов растений; определено общее содержание флавоноидов методом Фолина-Чокальтеу в 10 образцах. Наибольшее содержание фенольных соединений, в пересчете на мг-экв.галловой кислоты, выявлено в экстрактах монарды дудчатой, буквице лекарственной, шалфее мускатном, репешке аптечном, душице, воробейнике лекарственном; определено содержание кемпферола в экстракте цветков цмина песчанного и изокверцитрина в экстракте плодоножек воробейника лекарственного.

### Список литературы:

1. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton: CRC Press, 2006. –1197 p.
2. Matei A.O. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS / A.O. Matei, F. Gatea, G.L. Radu // Journal of Chromatographic Science. – 2015. – Vol. 53, Issue 7. – P. 1147–1154.
3. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, L.R. Rosa M. // Methods in Enzymology – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
4. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: [www.google.com/patents/US20120087980](http://www.google.com/patents/US20120087980). – Date of access: 21.02.2016.

### УНИКАЛЬНЫЙ ПРИРОДНЫЙ ШТАММ RAENIBACILLUS ENIMENSISIB-739

Мелентьев А.И., Логинов О.Н., Бойко Т.Ф., Актуганов Г.Э.  
Уфимский Институт биологии РАН, [mlnt@anrb.ru](mailto:mlnt@anrb.ru)

*Представлены данные, характеризующие редкие свойства природного штамма, позволяющие его использовать в качестве продуцента биологически активных веществ, полисахарида альгинатного типа, гидролитических ферментов и циклизующих глюканотрансфераз, а также биопрепаратов для растениеводства и животноводства.*

Аэробные спорообразующие бактерии хорошо известны как продуценты разнообразных продуктов микробиологического синтеза или основы биопрепаратов ростстимулирующего или фунгицидного действия. Их практическое использование обусловлено способностью продукции разнообразных экстрацеллюлярных гидролитических ферментов или низкомолекулярных вторичных метаболитов, проявляющих биологически активные свойства. Однако, выделяемые из природных местообитаний изоляты бактерий, как правило, проявляют невысокую целевую активность или продуктивность. Для повышения продуктивности используют разнообразные методы селекции или генетической модификации с целью

создания суперпродуцента того или иного продукта. Однако при этом, все энергетические и метаболические ресурсы генетически модифицированных клеток перестраиваются на исключительный синтез заданного продукта, а генетическая информация о других разнообразных веществах и продуктах находится в отключенном или приглушенном состоянии или вообще элиминируется. Безусловно, методами направленной селекции и генетической трансформации были получены многие бактериальные сверхпродуценты разнообразных продуктов, что способствовало развитию биотехнологического синтеза. Преимущества такого подхода в промышленной селекции неоспоримы, но возникает биотехнологическая проблема, – привязанность продукта к продуценту. Т.е., один продуцент – один продукт. Как избежать такой зависимости и можно ли получить универсальный штамм микроорганизмов, способный переключаться на преимущественный синтез того или иного продукта? Этот вопрос пока остается без ответа. Но есть примеры «счастливого случая» и ниже будет представлен один из них.

В лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии РАН с середины 80-х годов прошлого века интенсивно осуществлялся скрининг микроорганизмов, как возможных продуцентов ряда ферментных препаратов и биологически активных веществ и возможных агентов биоконтроля распространения болезней растений, среди почвенных изолятов, выделяемых из различных местообитаний. Среди множества выделенных изолятов наше внимание привлек штамм, отличавшийся некоторыми биохимическими характеристиками, не встречавшимися у других, а именно, способностью подавлять развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили, способностью к росту на безазотистой среде, способностью на средах с крахмалом образовывать кристаллы циклодекстринов, способностью к синтезу экзополисахаридов в жидкой среде вплоть до гелеобразования. В результате тщательного исследования его физиолого-биохимических, морфологических и культуральных признаков была установлена принадлежность штамма к аэробным спорообразующим бактериям, но в соответствии с существовавшими в то время таксономическими ключами, видовую принадлежность штамма установить не удавалось. Тем не менее, с целью депонирования и других протокольных мероприятий, штамм был определен как *Bacillus* sp. 739. В результате изучения спектра антигрибного действия данного штамма, было установлена способность угнетать развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили *Bipolaris sorokiniana* ряда видов *Fusarium* [7], а также возбудителей твердой головни *Tilletiacaries*, бурой ржавчины *Puccinia recondita*, желтой ржавчины *Puccinia striiformis* [6]. По результатам многолетних лабораторных и полевых испытаний штамм был рекомендован в качестве основы биопрепарата для борьбы с возбудителями болезней злаковых культур [8].

Дальнейшее изучение механизмов антагонистического действия штамма на микроскопические грибы позволило обнаружить его способность к секреции ряда гидролаз [1, 4] и низкомолекулярных белков, пептидов [15].

Среди гидролаз следует выделить способность штамма к секреции хитиназы (КФ 3.2.1.14) и хитозаназы (КФ 3.2.1.132). Хитиназа была представлена белками с молекулярными массами 78 и 87 кДа, хитозаназа одним – 47 кДа. Температурный и pH-оптимумы обоих ферментов находились в интервале 45-55°C и 6,0-6,5 соответственно. С помощью данного ферментного комплекса удалось осуществить гидролиз хитозана с преимущественным получением низкомолекулярных форм хитозана (3-6 кДа) [3].

Предполагалось, что эти два фермента, могут участвовать в процессах лизиса клеточных стенок микроскопических грибов. Действительно, исследование неочищенных препаратов ферментов выявило связь между хитиназной активностью и способностью подавлять рост микромицетов. Однако, в результате поэтапной очистки фермент утрачивает способность ингибировать рост грибов [5]. Выяснилось, что миколитическая активность штамма обусловлена присутствием в хитинолитическом комплексе фермента ламинариназы (КФ 3.2.1.6) [9], а антагонистическая активность проявляется веществами, содержащимися в низкомолекулярной фракции культуральной жидкости [15]. Из низкомолекулярной фракции были выделены термолабильные вещества, способные ингибировать рост *Helminthosporium sativum*. Один из них оказался белком с молекулярной массой 14 кДа, а еще два вещества являлись пептидами с массами менее 6 кДа.

Как отмечалось выше, штамм в определенных условиях был способен к трансформации амилозы в циклические декстрины. Однако он не отличался высоким уровнем продукции циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-аза, КФ 2.4.1.19), поэтому не рассматривался нами, как потенциальный продуцент данного фермента. Тем не менее, при более тщательном исследовании физико-химических и каталитических свойств ЦГТ-азы данного штамма обнаружилось, что он пригоден для получения циклодекстринов с большим содержанием альфа- и гамма форм, но при превалировании бета- циклодекстрина [12]. Максимальная каталитическая активность проявляется в интервале температур 40 – 45 °С, фермент стабилен в интервале pH от 5,5 до 8,5. Также были подобраны условия предподготовки крахмальных растворов высокой концентрации для ферментализации и определены оптимальные параметры для получения циклодекстринов с постоянным соотношением гомологов. Таким образом, штамм может быть использован при организации производства циклодекстринов полифракционного состава [13].

Следующим полезным (по мере обнаружения) свойством штамма является его способность образованию экзополисахаридов [14]. При

определенных условиях, а именно при отсутствии минеральных источников азота в среде, штамм образует экзополимер, вплоть до гелеобразного состояния культуральной среды. Детальное изучение химической природы и структуры этого экзополимера подтвердило его принадлежность к полисахаридам. Молекулярная масса определена около 350 кДа. Определение мономерного состава методами ИК-спектроскопии, ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{15}\text{C}$  выявило наличие D-маннуриновой и L-гиалуроновой кислот. Соотношение маннуриновой : гиалуроновой кислоты составило 0,32. По совокупности физико-химических свойств данный экзополисахарид отнесен к полимерам альгинатного типа с преобладанием гиалуроновой кислоты. Поскольку данный полимер обладает полиэлектролитной природой взаимодействия с солями в водных растворах, способностью в малых концентрациях резко воздействовать на реологические свойства водных систем, а также высокой склонностью к гелеобразованию у него есть перспективы применения в легкой, пищевой и нефтедобывающей промышленности. В этой связи штамм был запатентован и как продуцент экзополисахарида [10].

Выше отмечалось, что существовавшими в начале 90-х годов методами видовую принадлежность штамма установить не удалось. Однако современное состояние молекулярно-генетических методов предоставило возможность установить таксономическое положение штамма. По результатам секвенирования нуклеотидной последовательности гена ДНК, кодирующего 16SpPHK и на основании филогенетического анализа штамм был идентифицирован как *Paenibacillus ehimensis* IB-739 [13]. Последовательность гена зарегистрирована в базе GenBank за номером FN582329.1.

Совокупность вышеперечисленных свойств и качеств штамма *Paenibacillus ehimensis* IB-739 инициировала неожиданную идею его использования как основы для получения кормовой добавки. Предпосылками для этого послужили способность к продукции комплекса ферментов:  $\beta$ -1,3-глюканызы, ЦГТ-азы, протеазы, хитиназы и хитозанызы, а также выраженная антагонистичность к микроскопическим грибам, что должно способствовать улучшению разложения компонентов кормов, подавлению развития патогенных микромицетов и инактивации токсичных соединений. Все это, по нашему мнению, должно обеспечить повышение продуктивности животных и птицы за счет увеличения перевариваемости кормов, увеличение конверсии корма и усиление метаболических процессов в организме, снижение уровня заболеваемости животных и птицы, повышение сохранности поголовья. Предварительные исследования по применению водной суспензии бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB-739, состоящая из жизнеспособных клеток штамма и его метаболитов, или лиофилизированной культуры для в качестве добавки к рациону для вскармливания птицы и поросят дали положительные результаты, которые изложены в заявке на изобретение [2].

Более детальное исследование влияния препарата Бациспектин БМ на морфо-биохимические показатели крови, состояние желудочно-кишечного тракта, а также показатели живой массы молодняка и поросят подтвердили положительное влияние его использования как кормовой добавки [11]. Введение препарата в основной рацион молодняка гусей приводило к снижению холестерина в крови, увеличению общего белка, количества эритроцитов, концентрации гемоглобина. Отмечено подавление патогенной микробиоты в желудочно-кишечном тракте. При этом дополнительный привес у гусей составил от 7,7 до 17,7 %, у свиней 13,3 – 14,4%.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о значительном потенциале природных штаммов для целей биотехнологического получения разнообразных продуктов и препаратов. К сожалению, зачастую это дело случая.

### Список литературы:

1. Актуганов, Г.Э. Выделение и свойства хитозаназы штамма *Bacillus* sp. 739 / Г.Э. Актуганов, А.В. Широков, А.И. Мелентьев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. Т.39, №5. – С. 536-541.
2. Заявка на изобретение РФ № 2017106190/10. Штамм *Raenibacillusehimensis* IB-739 (ВКМ В-2680D) для получения мультиэнзимной кормовой добавки. / Г.Ф. Рафикова, Е.В. Логинова, А.И. Мелентьев, О.Н. Логинов / Заявл. 22.01.2017.
3. Ильина, А.В. Деполимеризация хитозана хитинолитическим комплексом бактерии рода *Bacillus* sp. 739 / А.В. Ильина, В.П. Варламов, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37, № 2. – С. 160-163.
4. Мелентьев, А.И. Выделение, очистка и характеристика хитиназы *Bacillus* sp. 739 / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 6. – С. 624-628.
5. Мелентьев, А.И. Роль хитиназы в проявлении антигрибной активности штаммом *Bacillus* sp. 739 / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов, Н.Ф. Галимзянова // Микробиология. – 2001. – Т.70, №5. – С.636-641.
6. Мелентьев, А.И. Бактерии-антагонисты фитопатогенных грибов / А.И. Мелентьев // Агро XXI. – 2001. – № 11. – С. 10-11.
7. Мелентьев, А.И. Изучение антагонизма между почвенными бациллами и микромицетами рода *Fusarium* LK: Fr. / А.И. Мелентьев, А.М. Еркеев // Микробиологический журнал. – 1990. – т. 52, № 1. – С. 53-56.
8. Патент РФ № 1743019, Штамм бактерий *Bacillus* sp. для получения препарата против грибных возбудителей болезней злаковых культур. / А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, О.Н. Логинов / Опубл. 1994.
9. Патент РФ № 2213773, Продуцент комплекса хитинолитических ферментов и ламинариназы / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов, Н.Г. Усанов, Л.Ю. Кузьмина / Опубл. 2003.

10. Патент РФ № 2460780 Продукт полисахарида. / Г.Г. Худайгулов, Г.Э. Актуганов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, Н.Н. Силищев / Оpubл. 2012.
11. Рафикова, Г.Ф. Эффективность кормовой добавки Бациспецин БМ при выращивании молодняка гусей и свиней / Г.Ф. Рафикова, М.Д. Бакаева, Е.В. Логинова [и др.] // Зоотехния. – 2017. – № 7. – С. 22-26.
12. Федорова, П.Ю. Биотехнология получения циклодекстриновополифракционного состава на основе продуцента *Raenibacillusehimensis* IB-739 : Автореф. дисс... канд. биол. наук. – Уфа, 2012. – 23 с.
13. Федорова, П.Ю. Бактерии *Raenibacillusehimensis* – новый источник циклодекстринглюканотрансфераз / П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев // В сб. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – М.: ВНИИПБТ, 2012. – С. 49-52.
14. Худайгулов, Г.Г. Экзополисахаридальгинатного типа *Raenibacillus ehimensis* 739 / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.– 2011. – Т.13, №5(3). – С. 214–217.
15. Широков, А.В. Белковые и пептидные факторы *Bacillus* sp.739 - ингибиторы роста фитопатогенных грибов / А.В. Широков, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т.38, № 2. – С. 161-165.

#### LED-ОСВЕЩЕНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ БИОСИНТЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *INVIVO* и *INVITRO*

Молчан О.В.<sup>1</sup>, Петринчик В.О.<sup>1</sup>, Запрудская Е.В.<sup>1</sup>,

Шабуня П.С.<sup>2</sup>, Фатыхова С.А.<sup>2</sup>, Лешина Л.Г.<sup>3</sup>, Булко О.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь, olga\_molchan@mail.ru

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

*Установлен спектральный состав и интенсивность света, стимулирующего накопление биомассы и биосинтез фармакологически ценных вторичных метаболитов в *Catharanthus roseus* G.Don. Определены основные требования к LED-освещению при выращивании *C. roseus* и получении лекарственного сырья с повышенным содержанием фармакологически ценных противоопухолевых терпеновых индольных алкалоидов винбластин и винкристина, а также аймалицина – алкалоида с гипотензивной активностью. Изучена регуляция физиолого-биохимических*