

СТВОРЕННЯ БІОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ БІОХІМІЧНИХ КОМПОНЕНТІВ РІЗНИХ ВИДІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ТА ВИЩИХ РОСЛИН

О.А. Бойко, кандидат біологічних наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України
С.П. Весельський, доктор біологічних наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
І.П. Григорюк, доктор біологічних наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України
М.Д. Мельничук, доктор біологічних наук
Національна академія аграрних наук України

*Розглянуто питання технологічних процесів формування біологічних препаратів, що базувались на основі біохімічних фракцій із грибів *Basidiomycetes* та вищих рослин. Останні слугували носіями підібраних компонентів, які застосовувались для виробничих цілей. Виконано багатопланові дослідження, в яких задіяно 15 видів грибів та рослинний матеріал різних родин. Перед використанням цього матеріалу проведено скринінговий аналіз на контамінацію його патогенами різної природи.*

Гриби, рослини, бактерії, віруси, біохімічні сполуки, продуктивність.

© О.А. Бойко, С.П. Весельський,
І.П. Григорюк, М.Д. Мельничук, 2014

Останнім часом окремими фірмами та науковими центрами розроблено багато біологічних препаратів, які застосовуються для формування продуктивного та якісного врожаю сільськогосподарських культур та цінних ліків [9,16–19].

Слід зауважити, що ці завдання є особливо актуальними, адже монокультура на полях, вирощування рослин за новими біотехнологіями часто породжують появу агресивних шкідників та патогенів, які непередбачено негативно впливають на якість продукції культур.

Разом з тим, зберігаючи комерційні основи, дослідники все більше уваги приділяють розробці біопрепаратів на базі компонентів живих систем, які повинні гармонічно взаємодіяти з екологічними ланцюгами за умов агроценозів та трансформованого середовища в біотехнологічному процесі.

Як відомо біологічно активні речовини належать до різного класу сполук як полімерної, так і гетероциклічної та наномерної будови. Серед цих компонентів виділяються пептиди, які є полімерними сполуками і в основному формуються із значної кількості амінокислот, з'єднаних амідними зв'язками. Часто ці сполуки відіграють важливу ключову роль у регуляції фізіолого-біохімічних процесів в організмі як тваринного, так і рослинного походження і практично завжди наявні в різних типах тканин. При цьому важливу роль відіграють також сполуки стероїдної будови.

Із мономерних компонентів з різною вихідною структурою молекул являють певний інтерес вільні амінокислоти, котрі самі безпосередньо можуть впливати на хід різних процесів в організмі тварин та рослин, а також здатні бути основою для біосинтезу окремих гормонів та медіаторів. Саме в зв'язку з вищенаведеним у своїх дослідях ми в першу чергу оцінювали загальний рівень сполук рослинного походження, грибів та комплексного вихідного препарату. При цьому нами підбирались різні види *Basidiomycetes*, які є продуцентами широкого набору речовин метаболітів [2–4,8], фітогормонів, інгібіторів, антибіотиків.

Крім того, наприклад, грибний культуральний білок вищих їстівних базидіоміцетів містить незамінні амінокислоти, що дає змогу отримувати харчову біомасу за умов технологічного процесу [5].

Необхідно зазначити, що більшість робіт із застосуванням шапинкових грибів у різних галузях на жаль не проходять первинного скринінгу на контамінацію та ураження їх патогенами різної природи. При цьому, це стосується і рослинного матеріалу, який використовується у відповідних технологічних процесах при вирощуванні грибів та формуванні спільних біохімічних фракцій із плодових тіл і рослин. І це тоді, коли із міцелію та грибів виділяються за нашими дослідженнями більше п'ятнадцяти патогенів різних таксономічних груп [2]. Ця ситуація викликає значні негативні впливи на якість продукції для різного застосування. Потрібно підкреслити, що ліки на основі біохімічних компонентів таких грибів втрачають свою здатність лікувальної активності.

Таким чином, сировина різних видів грибів, рослин завжди повинна відбиратись із якісних біологічних об'єктів для подальшого їх застосування. В іншому випадку дослідники і виробничники будуть мати справу в технологічному процесі із структурами мікроскопічних грибів, вірусів, бактерій. Наприклад, у деяких видів грибів, при ураженні їх псевдомонсами (бактерії) проявляють активність бактеріофаги та такі структури, як піровердін, що надають певні властивості бактеріальним клітинам, змінюючи їх функції [2].

Мета досліджень – створення біопрепаратів на основі біохімічних компонентів базидіоміцетів та рослин.

Матеріали та методика досліджень. Відбір грибів проводили за умов природного довкілля та технологічних процесів для подальшого їх аналізу на контамінацію патогенами та отримання біохімічних фракцій із здорових плодових тіл [2,3]. Для цього визначали вид базидіоміцетів, оцінювали габітус їх плодових тіл, ураження вірусами, бактеріями та мікроскопічними грибами. У технологічному процесі були задіяні: люмінесцентна та трансмісивна електронна мікроскопія, ІФА, метод Ухтерлоні, визначення мікроорганізмів за умов поживного середовища, електрофоретичний аналіз білків та діагностика патогенів на основі вперше розробленого нами експрес-методу, який виявився продуктивним для цих цілей [2].

Було використано 15 видів грибів, які відбирали для подальших досліджень. При цьому, фракції грибів отримували та оцінювали за трьома позиціями: гомогенату грибів у фосфатному буфері (рН 7,2, 1/15 м); фракціювання при 8–10 тис. об/хв, 15 хв при низькошвидкісному центрифугуванні (використання надосадової рідини); диференціально го центрифугування (високошвидкісне 25–30 тис. об/хв 35 хв, застосування з доочищенням осаду) розділення супернатанту через гель-фільтрацію.

У роботі також використано спосіб для отримання фракцій грибів, який застосовувався при виділенні внутрішньоклітинних глікозидаз мікроорганізмів (модифікація Варбанець Л.В. та Борзової Н.В.) [6]. Суть методу полягає у тому, що біомасу суспендували у 0,01 М калійфосфатному буфері (рН 7,2) з подальшою обробкою суспензії ультразвуком (22 кГц при 0,4 А) з декількома повторностями. Гомогенат після такого його отримання центрифугували 30–35 хв при 10000 об/хв, після чого супернатант аналізували на активність та піддавали подальшому доочищенню (гель фільтрації).

Як носії біопрепаратів використовували біохімічні композиції сполук із рослин родин айстрових, ранникових, березових, жимолестових, коноплевих.

Залежно від цілей остаточний препарат формували в різних комбінаціях [10, 11].

Як модельну систему для оцінки росту і розвитку рослин під дією різних варіантів препарату визначали на сіянцях соняшнику, які як виявилось, чутливо реагували на різні зміни в композиціях препарату. Результати досліджень давали змогу відібрати гомогенати видів грибів, які стимулювали ріст і розвиток сіянців соняшнику (сорт Запоріжський). Саме ці критерії було закладено в основу підбору первинного стимулюючого гомогенату певного виду грибів з наступним його доочищенням та біохімічним аналізом.

Цей технологічний підхід давав змогу підібрати фракції з рідкісних видів грибів, які за своїми властивостями адаптувались на основі препарату до застосування у виробничих умовах на відповідних сільськогосподарських культурах.

Нині на цій основі нами розроблено 4 варіанти біопрепарату (Біоекофунге – 1). Зміна біохімічних складових препарату та їх носіїв давали змогу вирішувати завдання із застосуванням для різних цілей комплексної дії: антипатогенного впливу, застосування за умов *in vitro* та закритого ґрунту, обробка насіння і вегетуючих рослин в агроценозах. При цьому необхідно зазначити, що отриманий комплексний препарат можна фасувати в рідкому та ліофілізованому стані. Відповідно до різних вимог основна композиція біоречовин може бути доповнена природними мінералами (препарат «БОА», «Біоекофунге – 1»).

Для визначення рівня компонентів пептидної природи були застосовані такі методи: біохімічної фотометрії [1], визначення фізіологічно активних пептидів [15]. У досліджуваних зразках препаратів речовини ліпідної [12], в тому числі і стероїдної природи, екстрагували і розділяли на основі тонкошарової хроматографії [13]. Загальний рівень амінокислот у зразках оцінювали за допомогою характерної для них нінгідрин – позитивної реакції на фотоелектроколориметрі (КФК-2) [7].

Результати досліджень. Як показало вивчення структури біоречовин препарату («Біоекофунге -1») одним із його компонентів є гумулон(α-кислота), що був носієм компонентів для грибів [20].

Крім того, як відомо, біосинтез білка в клітинах грибів може мати різну активність і відповідну наявність речовин пептидної природи. Як показали наші дослідження, концентрація речовин пептидної природи в зразках рослинного походження була найвищою (табл.1).

1. Концентрація пептидів у фракціях із рослин, грибів та комплексному біопрепараті (мг, %)

Витяжка із рослин	Біохімічна фракція із грибів	Комплексний препарат
-------------------	------------------------------	----------------------

M – 72,2 ± m 2,9	51,5 2,1	43,4 1,8
---------------------	-------------	-------------

Зокрема концентрація цих сполук у комплексі із хмелю перевищувала на 40% рівень пептидів із грибів та на 66,4 % була вищою ніж у комплексному препараті. При цьому, не виключено, що ізольована фракція із рослин може мати більш високу біологічну активність чи ефективність впливу на хід певних фізіолого-біохімічних процесів у піддослідних об'єктах завдяки наявності речовин пептидної природи.

Проте відомо, що при дії біологічних препаратів часто проявляється комплексна взаємодія між різними складовими в регуляції перебігу окремих фізіолого-біохімічних процесів в організмі піддослідних об'єктів. І наші подальші дослідження виявили суттєві відмінності в кількісному вмісті фосфоліпідів та фітостеринів у витяжках – компонентах із рослин, грибів та загальному комплексному препараті (табл.2).

2. Концентрація фосфоліпідів та фітостеринів у препаратах різного походження (мг, %)

Витяжка із рослин	Біохімічна фракція із грибів	Комплексний препарат
Фосфоліпіди		
M – 34,4 ±m 2,2	112 9,2	63,2 2,8
Фітостерини		
M – 29 ± m 0,12	14,6 0,65	8,3 0,29

Окрім того, на тонкошарових хроматографіях виявились декілька мізерних фракцій із фосфорномолібденовою кислотою, котрі не вдавалось ідентифікувати.

Зазначимо, що концентрація фосфоліпідів у витяжці з гриба більше ніж у тричі (327,2%) перевищувала їх рівень в екстрактах із рослин та на 78,3% була більше ніж у комплексному препараті.

У цій гідрофобній витяжці із грибів при розділенні за допомогою тонкошарової хроматографії виявилася вагома фракція ліпідів Rf – 0,29, близькою до холестерину Rf – 0,27, яка належить до фітостеринів. Зазначимо, що у витяжці з грибів фітостеринів було в п'ять разів більше (503,4%) ніж в екстрактах із хмелю та на 75,9% більше ніж у комплексному препараті. При цьому, слід зазначити, що фітостерини з екстрактів гриба давали потужну ніжно-блакитну флуоресценцію, тоді як у препаратів із рослин цього не спостерігалось, а в комплексному препараті вона була менш яскравою. Холестерол за таких умов в ультрафіолетових діапазонах світла не виявляється.

При визначенні загального рівня амінокислот за нінгідрінпозитивною реакцією різниця між дослідними препаратами була найбільшою (табл.3). Особливо багатим на ці органічні складові виявився екстракт із грибів.

3. Концентрація вільних амінокислот у препаратах різного походження (мг, %).

Витяжка із рослин	Біохімічна фракція із грибів	Комплексний препарат
M – 5,24	45,2	9,2

Необхідно підкреслити, що в препаратах із грибів амінокислот було у 8,6 рази вище, ніж в екстрактах із рослин. У комплексному препараті виявилось вільних амінокислот у п'ять разів менше, ніж у витяжках із грибів.

Висновки

Отже, «Біоекофунге-1» складався із біохімічних сполук – фосфо-ліпідів, фітостеринів. У комплексному препараті виявлено в декілька разів менше вільних амінокислот, ніж у концентрованому препараті грибів. Враховуючи ці показники, нам вдалося підібрати відповідний набір біохімічних компонентів для різних культур: сої, цукрового буряку, соняшнику, картоплі, кукурудзи, томату, пшениці, хмелю для їх стимуляції росту і розвитку, зменшення ураження рослин РНК-вмісними вірусами, деякими бактеріями та мікроскопічними грибами.

При цьому препарат може бути багатоконпонентним при додаванні до його складу природних мінералів.

Список літератури

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии / В.С.Асатиани. – М.: Наука, 1965. – С.522–529.
2. Бойко О.А., Морфологія та структурні особливості патогенів Basidiomycetes / О.А.Бойко, Т.П.Шевченко, А.А.Бойко // Мікробіологічний журнал. – 2013. – Т.75, №3. – С. 54–59.
3. Бойко О.А. Гриби (Basidiomycetes): властивості в екологічних нішах, продуценти біологічно активних речовин /О.А.Бойко, І.П.Григорюк, М.Д.Мельничук //Агроекологічний журнал. – 2011. – №3. –С.69–75.
4. Ботаніка. Водорості та гриби: навч.посіб. /[І.Ю.Костіков, В.В.Джаган, Е.М.Демченко та ін.]. – К.: Арістей, 2006. – 476 с.
5. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С.Бухало. – К.: Наук.думка, 1988. – 180с.
6. Варбанець Л.Д. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження / Л.Д. Варбанець, Н.В. Борзова. – К.:Наук. думка, 2010. - 440 с.
7. Великанова О.А. Спектрофотометрический метод определения сумарного количества амінокислот в сыворотке крови /О.А.Великанова, Ю.В.Полиев //Лабораторное дело. – 1981. – №11. – С.101–103.
8. Древаль К.Г. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів /К.Г.Древаль, М.І.Бойко //Біотехнологія. – 2011. – Т.4, №1. – С.87–92.
9. Левицкий А.П. Пребиотики и проблема дисбактериоза / А.П.Левицкий, Ю.Л.Волянский, К.В.Скидан // АМНУ «Институт микробиологии и иммунологииим. И.И.Мечникова АМНУ». – Х.: ЭДЭНА, 2008. – 100с.
10. Пат. № 72957 Україна. Спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (Basidiomycetes) / Мельничук М.Д., Бойко О.А., Дубровін В.О. та ін.). – № u201114539; заявл. 07.12.2011; опубл. 10.09.2012, Бюл.№17.

11. Пат. 53983 Україна, АО1С 21/00 СО5F 11/00. Композиція біохімічних речовин для стимуляції продуктивності та захисту від хвороб сільськогосподарських рослин / Бойко О.А., Мельничук М.Д., Бойко А.Л., Григорюк І.П., Дубровін В.О. – № u201004473; заявл. 16.04.2010; опубл. 25.10.2010, Бюл. №20.
12. Пат. 33564 Україна МБН А61В514. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельський С.П., Лященко П.С., Костенко С.Г., Потенко З.А., Куровська Л.Ф. – №99031324; опубл. 15.02.2001, Бюл. №1.
13. Петровский В.И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови /В.И.Петровский, М.И. Речеранд, Е.И.Лизенко // Лабораторное дело. – 1986. – №6. – С.339–343.
14. Пидюра О.І. Рід *Medicago* L. (*Fabaceae*) у флорі України / О.І.Пидюра. – К.: Аграрна наука, 1998. – 74 с.
15. Помазков О.А. Физиологически активные пептиды /О.А.Помазков. – М.: Наука, 1995. – 141 с.
16. Пономаренко С. Стимулятори росту рослин / С.Пономаренко, Л. Анішин // Енергозберігаючі агроєкосистеми: рекомендації / [під. ред. член-кор. НААН Ю.О. Тараріко]. – К.: «ДІА», 2011. – С.416-444.
17. Секан А.С. Сучасні методи молекулярного аналізу генетично модифікованих рослин / А.С.Секан, Б.В.Сорочинський // Біотехнологія. – 2011. – Т.4, №1. – С.106–114.
18. Фізіологічна активність компонентів вермикомпосту та створення на його основі комплексного регулятора росту / І.В. Дроговоз, М.В. Волкогон, В.К. Яворська [та ін.] // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – Т.38, №4. – С.292–300.
19. Фітосанітарна безпека /[П.О.Мельник, В.Я.Даньков, М.П.Соломійчук та ін.].– К.: Аграрна Наука, 2012. – 160с.
20. Хмель и его использование / [Годованый А.А., Ляшенко Н.И. и др.]. – К.: Урожай, 1990. – 336 с.
21. Hervey C.L., Wuest P.S., Schisler L.C. Diseases weed molds indicator molds and abnormalities of com. mushroom: pen state handbook for commercial mushroom growers. – Pennsylvania State University, 1982. – P.19–33.

Рассмотрены вопросы технологических процессов формирования биологических препаратов, которые базировались на основе биохимических фракций из грибов Basidiomycetes и высших растений. Последние служили носителями подобранных компонентов, которые применялись для производственных целей. Выполнены многоплановые исследования, в которых задействовано 15 видов грибов и растительный материал различных семейств. Перед использованием этого материала проведен скрининговый анализ на контаминацию его патогенами различной природы.

Грибы, растения, бактерии, вирусы, биохимические соединения, производительность.

The problems of technological processes of forming biochemical preparation, which based on biochemical fractions from Basidiomycetes mushrooms and plant sare considered. The last one (plants) were carriers of selected components, which

were applied for manufacture purposes. During making multifaceted experiments the 15 types of mushrooms and plant material of different families were involved. Screening analysis of contamination it with pathogens of different nature were conducted before using this material.

Mushrooms, plants, bacteria, viruses, biochemical compounds, productivity.