

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский государственный аграрный университет –  
МСХА имени К.А. Тимирязева»

*На правах рукописи*

**ХАТЕМ АМЖАД**

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ШТАММА *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*  
ВКМ F-4876 D БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЁМ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЁ  
ВЛИЯНИЯ НА ПАТОГЕНЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
ДЖАВАХИЯ Вахтанг Витальевич  
кандидат биологических наук

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Значение биологических препаратов в сельском хозяйстве, пищевой и фармацевтической промышленности.....	12
1.2 Применение биопрепаратов на основе антагонистических микроорганизмов для защиты растений .....	14
1.3 Применение в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе грибов рода <i>Penicillium</i> .....	16
1.4 Антимикробные пептиды (АМП), общая характеристика и применение.....	18
1.5 Возможность применения препаратов на основе статинов для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных микроорганизмов.....	21
1.6 Получение высокопродуктивных штаммов методом мутагенеза и последующей селекцией.....	26
1.6.1 Использование методов химического и физического мутагенеза.....	26
1.6.2 Способ отбора спонтанных мутаций .....	28
1.6.3 Отбор мутантов на основе изменения морфологического признака .....	28
1.7 Условия культивирования штаммов-продуцентов .....	28
1.7.1 Источники углерода .....	30
1.7.2 Источники азота .....	32
1.7.3 Минеральные элементы.....	34
1.8 Организация и проведение биотехнологических процессов .....	34
1.8.1 Определение ключевых параметров биотехнологического процесса .....	34
1.8.2 Используемое в биотехнологическом производстве ферментационное оборудование.....	37
1.8.3 Оборудование, предназначенное для отделения промежуточных полупродуктов от конечного целевого продукта .....	40
1.8.4 Стабилизация целевых материалов .....	42
Заключение .....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	44

2.1 Материалы исследований .....	44
2.1.1 Химические реактивы, использованные в данной работе .....	44
2.1.2 Микроорганизмы, использованные в работе.....	45
2.1.3 Среды и условия культивирования.....	45
2.1.3.1 Состав сред для поддержания микроорганизмов .....	45
2.1.3.2 Приготовление питательных сред .....	46
2.1.3.3 Приготовление картофельно-глюкозного агара (КГА) .....	47
2.1.3.4 Культивирование микроорганизмов на твердой агаризованной среде .....	47
2.1.4 Ферментационные установки для культивирования штамма <i>P. chrysogenum</i>	47
2.1.4.1 Описание ферментационной установки №1 .....	48
2.1.4.2 Описание ферментационной установки №2.....	49
2.1.4.3 Описание ферментационной установки №3.....	51
2.1.4.4 Описание высокоскоростной центрифуги .....	52
2.1.4.5 Описание лиофильной сушилки .....	54
2.2 Методы исследований.....	56
2.2.1 Получение штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D с помощью ненаправленного индуцированного мутагенеза.....	57
2.2.2 Очистка и фракционирование белков .....	58
2.2.2.1 Приготовление осветленного лизата .....	58
2.2.2.2 Высаливание белков из раствора.....	59
2.2.2.3 Диализ.....	59
2.2.3 Анализ методом SDS-ПААГ электрофореза .....	60
2.2.3.1 Пробоподготовка образцов белка .....	60
2.2.3.2 Электрофорез.....	61
2.2.3.3 Визуализация геля методом окрашивания серебром.....	62
2.2.4 Изучение влияния белков <i>P. chrysogenum</i> на метаболическую активность фитопатогенных грибов .....	64
2.2.5 Определение содержания мевастатина в культуральной жидкости методом ВЭЖХ .....	65
2.2.6 Определение содержания биомассы в культуральной жидкости .....	67

2.2.7 Исследование противогрибной активности методом радиального роста .....	68
2.2.8 Статистическая обработка данных .....	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	70
3.1. Получение штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D, обладающего повышенной противогрибной активностью .....	70
3.1.1 Построение кривой выживаемости <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-1310 .....	70
3.1.2. Отбор изолятов и оценка противогрибной активности.....	71
3.2 Определение вторичных метаболитов в биомассе <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D.....	72
3.2.1. Идентификация мевастатина.....	72
3.2.2. Результаты электрофореза белковых фракций, выделенных из биомассы <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D .....	73
3.2.3 Изучение влияния белков, выделенных из биомассы <i>P. chrysogenum</i> F-4876D на метаболическую активность гриба <i>B. cinerea</i> и <i>F. oxysporum</i> .....	76
3.3 Оптимизация состава питательной среды .....	76
3.3.1 Изучение влияния источника углерода на биосинтез мевастатина и накопление биомассы <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D.....	77
3.3.2 Влияние источников органического азота на биосинтез мевастатина и накопление биомассы в культуральной жидкости <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D .	79
3.3.3 Изучение влияния дополнительных источников азота на рост <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D и биосинтез мевастатина.....	82
3.3.4 Изучение влияния минеральных солей на накопление мевастатина и биомассы <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D .....	84
3.4 Оптимизация количества сахара в питательной среде для культивирования штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D.....	86
3.5 Культивирование штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D в ферментационной установке объёмом 15 литров .....	87
3.5.1 Культивирование штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D при нерегулируемом режиме ферментации в ферментере объёмом 15 литров. ....	87

3.5.2 Культивирование штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D в ферментационной среде в режиме регулирования водородного показателя.....	90
3.5.3. Культивирование штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D на ферментационной среде в условиях регулирования водородного показателя в культуральной жидкости контроля и концентрации растворенного кислорода.....	91
3.7 Масштабирование процесса культивирования штамма <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л.....	95
3.8 Получение сухой биомассы <i>P. chrysogenum</i> ВКМ F-4876D.....	98
3.9 Определение противогрибного эффекта сухой биомассы <i>P. chrysogenum</i> в комбинации с химическими фунгицидами.....	98
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	116

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В современной системе возделывания сельскохозяйственных культур ведущее место в арсенале средств борьбы с фитопатогенными микроорганизмами принадлежит методам химической защиты. В то же время, результатом постоянного использования синтетических пестицидов стало как снижение их эффективности, так и существенное накопление остатков в почве, водоемах и получаемой сельскохозяйственной продукции, что является существенным фактором риска, способным оказать негативное влияние на здоровье человека, животных и экологической системе в целом. Наряду с этим, выявлена резистентность патогенных микроорганизмов к используемым химическим средствам защиты. В настоящий момент мировое сообщество столкнулось не только с проблемой увеличения вредоносности уже известных патогенов, но и появлением новых опасных видов фитопатогенных микроорганизмов, зачастую из числа карантинных объектов.

В связи с этим, основная тенденция развития сельскохозяйственной отрасли, как в мире, так и в России, заключается в поиске новых эффективных методов ведения сельского хозяйства, обеспечивающих защиту растений от фитопатогенов, охрану окружающей среды и безопасность получаемой продукции. Одним из способов решения вышеперечисленных проблем может стать использование микробиологических средств защиты растений на основе полезных микроорганизмов и их метаболитов. Данные средства выгодно отличаются от химических: безопасны для человека и животных, обладают высокой эффективностью и избирательностью действия в отношении широкого спектра известных фитопатогенов, характеризуются отсутствием к ним резистентности патогенных организмов, коротким сроком ожидания отклика, высокой экологической безопасностью.

Тем не менее, несмотря на все преимущества биологических способов защиты сельскохозяйственных растений, отказ от современных фунгицидов невозможен, поскольку их применение обеспечивает высокоэффективный контроль развития болезней. Одним из актуальных способов снижения ксенобиотической

нагрузки на агробиоценозы может стать сочетание химических средств защиты с методами биоконтроля.

Применяемые биопрепараты должны удовлетворять как минимум двум условиям. Во-первых, эффективно подавлять рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов. А во-вторых, не оказывать негативного воздействия на растения, насекомых, животных и человека. В связи с чем, актуальным становится как поиск штамма, на основе которого будет получен препарат с противогрибным действием, так и разработка современной и конкурентной технологии его получения.

**Степень разработанности темы исследований.** Анализ доступных патентных документов и данных литературы показал, что к настоящему времени известны бактериальные и грибные штаммы, продуцирующие разнообразные по структуре биологически активные вещества, обладающие антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам. На данный момент на территории Российской Федерации зарегистрированы биопрепараты, как правило, на основе бактерий родов *Bacillus* (БФТИМ КС-2; Баксис, Ж; Аллирин-Б; Бактофит, СП и др.) и *Pseudomonas* (Псевдобактерин – 2, Ж; Гуапсин плюс, Ж; Ризоплан, Ж; Биокомпозит-Про, Ж и др.). Ассортимент биофунгицидов, в которых действующим началом является биомасса непатогенных грибов, не столь разнообразен и представлен препаратами на основе штаммов, принадлежащих к роду *Trichoderma* (Глиокладин, СП; Стренифаг, СП; Трихоплант, СК и др.).

Перспективными для разработки биопрепаратов для защиты растений являются некоторые представители рода *Penicillium*, вторичные метаболиты которых обладают широким диапазоном действия против возбудителей заболеваний сельскохозяйственных растений.

Так, известен штамм гриба *P. vermiculatum*, депонированный в коллекции чистых культур Всероссийского института защиты растений, и разработанный препарат Вермикулен на его основе.

Недостатком этого препарата на основе живых микроорганизмов является малый срок хранения и чувствительность к условиям окружающей среды.

Таким образом, по-прежнему остаются открытыми вопросы разработки технологии производства эффективных биопрепаратов, в том числе на основе грибных штаммов.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы: разработать эффективную технологию получения сухой биомассы гриба *Penicillium chrysogenum* и оценить ее противогрибной эффект по отношению к выбранным тест-культурам.

Задачи:

1. Методами селекции получить штамм *P. chrysogenum*, обладающий высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным тест-культурам.

2. Подобрать оптимальный состав питательной среды для получения биомассы *P. chrysogenum*.

3. Определить оптимальные технологические параметры ферментации, способствующие максимальному выходу биомассы *P. chrysogenum* в ферментационной установке объемом 15 л.

4. Провести апробацию результатов исследования в ферментационной установке объемом 100 л в режиме контроля параметров pH и  $pO_2$  и осуществить масштабирование процесса культивирования в 1000 л ферментере.

5. Разработать эффективную технологическую схему получения сухой биомассы *P. chrysogenum*.

6. Изучить противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* отдельно и в комбинации её с фунгицидами на тест-культурах.

**Научная новизна.** Определены оптимальные условия культивирования, обеспечивающие выход биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D с высокой противогрибной активностью.

Определены параметры культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационных установках объемом 15 л. На основании полученных результатов проведена апробация процесса культивирования в ферментере объемом 100 л и масштабирование процесса культивирования в ферментационной установке объемом 1000л.



Разработана оптимальная технологическая схема получения сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D.

Впервые продемонстрирована возможность комбинированного применения химических фунгицидов с сухой биомассой *P. chrysogenum*. Полученный в итоге данного сочетания синергетический или аддитивный эффект позволил без потери эффективности уменьшить рабочие концентрации химических фунгицидов до таких значений, при которых они неэффективны при использовании в качестве монопрепарата.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о физиологических свойствах *P. chrysogenum*, влиянии элементов питания и условий культивирования штамма на рост и активность его по отношению к растительным фитопатогенам. Установленный аддитивный эффект комбинированного применения сухой грибной биомассы и коммерчески используемых фунгицидов имеет большое практическое значение, поскольку научно обосновывает перспективу снижения эффективных дозировок химических средств контроля, необходимых для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами. Это поможет, в первую очередь, смягчить воздействие пестицидов на окружающую среду. А во-вторых, отсутствие механизмов развития резистентности у фитопатогенных микроорганизмов к биопрепаратам открывает перспективу успешного контроля за развитием заболеваемости сельскохозяйственных растений без увеличения дозировок фунгицидов.

Разработана техническая документация на проведение процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л.

Таким образом, результаты, полученные в процессе реализации данной работы, являются научным обоснованием для появления на рынке нового высокоэффективного и экологически безопасного противогрибного препарата для контроля за поражением сельскохозяйственных культур фитопатогенными микроорганизмами.

**Методология и методы исследования.** В основе теории и методологии диссертационной работы лежат труды российских и зарубежных ученых, направленные на изучение биотехнологических способов получения грибных штаммов, обладающих высокой противогрибной активностью, а также биологических способов контроля болезней сельскохозяйственных растений.

В работе были использованы общепринятые и модифицированные методы промышленной биотехнологии, аналитической химии и фитопатологии. Все определения были выполнены с использованием современных методов анализа и на современном оборудовании, позволяющем получать результаты с высокой достоверностью.

**Положения, выносимые на защиту:**

- Установлено влияние источника азота и количества вносимого углерода на накопление биомассы и выход мевастатина у *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D;

- Определены параметры культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационных установках объемом 15 л;

- Проведена апробация процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментере объемом 100 литров в режиме параметров контроля pH и pO<sub>2</sub>.

- Проведено масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л.

- Установлено противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по отношению к тест-культурам (*F. oxysporum*, *A. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*);

- Показан аддитивный фунгицидный эффект при применении комбинации сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и химических фунгицидов – азоксистробина, пропиконазола, тебуконазола и комбинации пикоксистробина и ципроконазола (Аканто плюс).

**Степень достоверности и апробация работы.** Диссертационная работа выполнена на современном оборудовании с использованием современных общепринятых и адаптированных для данной работы методик.

**Публикации результатов исследования.** По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 2 – в международных изданиях Scopus и Web of Science.

Также результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на следующих конференциях: Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 160-летию В.А. Михельсона (Москва, 2020); Всероссийская с международным участием научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённой 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (Москва, 2021); IX Международная научная студенческая конференция «Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития- 2021» (Воронеж, 2021); Всероссийская конференция молодых исследователей «АГРАРНАЯ НАУКА – 2022» (Москва, 2022); Всероссийский круглый стол «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии», посвященный 150-летию со дня рождения В.С. Буткевича-2022» (Москва, 2022); X Международная научная студенческая конференция «Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития - 2022» (Воронеж, 2022); International youth forum «Russia-Africa: nuclear education-potential for successful development» (2023).

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в анализе и сборе информации для литературного обзора, проведении лабораторных опытов, проведении ферментаций в лабораторных и опытно-промышленных установках. Разработка программы исследований и выбор необходимых для её осуществления методов, а также систематизация, анализ полученных результатов, формулирование основных выводов и подготовка публикаций по теме исследований выполнены при участии научного руководителя.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, обсуждения результатов, заключения, содержит 24 таблицы, 30 рисунков. Список библиографических источников включает 138 наименований, в том числе 104 на иностранных языках.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Значение биологических препаратов в сельском хозяйстве, пищевой и фармацевтической промышленности

На протяжении тысячелетий человек использует дрожжи, плесневые грибки и бактерии для производства таких продуктов питания, как хлеб, пиво, вино, сыры, йогурт и др. Благодаря использованию микроорганизмов получен ряд фармацевтических субстанций, оказавших существенное влияние на развитие медицины и фармации (Karoo D., 2020). На сегодняшний день биотехнология является наиболее значимым и быстрорастущим сегментом науки, который находит свое практическое применение и обеспечивает устойчивое развитие многих отраслей экономики.

В современном сельском хозяйстве, наряду с использованием гибридных семян, высокоурожайных сортов, химических удобрений и современных систем орошений, применение микроорганизмов или их метаболитов в качестве удобрений или средств контроля за развитием различных заболеваний становится все более актуальным (Kumar R., 2017). Биоудобрения, биопестициды, биогербициды и биоинсектициды, полученные с использованием микроорганизмов, играют все более значимую роль в развитии аграрной отрасли во всем мире, в том числе и России.

К биоудобрениям относят удобрения, основными составляющими компонентами которых являются живые микробные инокулянты, включающие водоросли, грибы, бактерии как по отдельности, так и в комбинации, обладающие способностью повышать доступность для растений необходимых для роста и развития питательных веществ в почве (Sandle T., 2019).

К настоящему времени проведено множество исследований, посвященных использованию микроорганизмов или их ассоциаций для производства биоудобрений. На основе выполняемых функций или характера так называемого действующего вещества, можно выделить следующие группы микроорганизмов:

*Ризобии* — это бактерии, обитающие в почве, которые обладают способностью клонироваться в линии корней бобовых растений и могут фиксировать большую часть свободного азота. По количеству фиксируемого ими азота они являются наиболее эффективными биоудобрениями (Mia M.V., 2010).

*Арбускулярные микоризные грибы*: внутриклеточные облигатные микробы присутствуют в коре корней высших растений и поглощают из почвы необходимые элементы, включая фосфор, цинк и серу. Они могут работать как биоудобрение и в основном включают представителей рода *Glomus* (Wu S.C., 2005).

*Азотобактер*: помимо ризобияльных бактерий, азотобактер также обладает способностью фиксировать азот. Несколько видов азотобактеров присутствуют в почве и могут действовать как биоудобрение (Abdel-Aziez S.M., 2014).

*Цианобактерии* представляют собой сине-зеленые водоросли, которые встречаются как свободноживущие или в виде симбиотических ассоциаций с культурой риса, и могут производить связанный азот в количестве 20–30 кг азота на гектар в идеальных условиях; в настоящее время они используются в качестве биоудобрения (Mishra U., 2004).

*Аспергиллы*: они присутствуют в ризосферной зоне злаковых растений, а также во внутриклеточных пространствах коры корней этих растений. Они действуют как биоудобрение, делая растения устойчивыми к болезням, толерантными к засухе и стимулируя рост производства веществ (Mehnaz S., 2015).

*Пеницилл* - это род грибов, которые играют важную роль в природе и используются в различных отраслях промышленности, включая производство сыров, антибиотиков и других продуктов. Некоторые виды *Penicillium* также используются для производства ферментов, которые используются в пищевой промышленности. Кроме того, *Penicillium* может использоваться для контроля роста бактерий в окружающей среде.

*Триходерма* - это род грибов, который включает в себя более 100 видов. Некоторые из них являются полезными, а некоторые - вредными для растений. Полезные виды триходермы используются для защиты растений от болезней, а вредные могут вызывать заболевания у растений.

Следующая группы биопрепаратов, активно применяемых в сельском хозяйстве – это биоинсектициды и биогербициды.

*Биоинсектициды* разработаны для минимизации использования синтетических инсектицидов за счет использования микроорганизмов. Из-за кратчайшего срока годности они быстро разлагаются в окружающей среде и относятся к экологически чистым препаратам. Так, насекомые могут поражаться 200 грибами, способными контролировать их популяцию (Putter I., 1981).

*Биогербициды*: используя патогенные микробы, ученые создали биологический инструмент для борьбы с нежелательными сорняками и вредителями. Эти микробы обладают инвазивными генами и могут атаковать сорняки и убивать их (Hoagland R.E., 2007).

## **1.2 Применение биопрепаратов на основе антагонистических микроорганизмов для защиты растений**

В современных условиях развития сельского хозяйства получение в достаточном количестве растениеводческой продукции без применения эффективной системы защиты растений, невозможно (Ghorbanpour M., 2018), (Fisher M.C., 2018), (Davies C. R., 2021). Среди возбудителей заболеваний, приводящих к значительным экономическим потерям, вудущее место принадлежит микроскопическим грибы (Shcherbakova L.A., 2019), (Derevnina L., 2016). Анализ доступных данных литературы показал, что за прошедшие 10 лет в мире возросло количество пораженных фузариозом партий зерна составило: пшеница — 59%, ячмень — 46%, рис — 58%, кукуруза — 50%. Вдвое увеличелось поражение зерна пшеницы, риса и кукурузы грибами рода *Aspergillus*. Потери сельскохозяйственной продукции в мире от поражения токсиногенными грибами и загрязнения микотоксинами за последние 10 лет увеличились в 9 раз и достигли 22 млрд. долларов в год, в России — около 7 млрд. рублей .

В арсенале мер борьбы с разнообразными фитопатогенными микроорганизмами, особенно в системах интенсивных технологий возделывания

сельскохозяйственных культур, лидирующая позиция принадлежит химическим методам (Lucas J.A., 2015), (Morgunov I.G., 2017), (Shao J., 2021). Тем не менее, несмотря на свою экономическую и биологическую целесообразность, результатом неограниченного применения в достаточных количествах синтетических химических средств привело как к значительному уменьшению их эффективности (Hahn M., 2014), так и накоплению их остатков в почве, водоемах и сельскохозяйственной продукции. (Campbell V. C., 2012), (Benedict K., 2016). Для ряда фитопатогенных микроорганизмов выявлена устойчивость к применяемым химическим веществам (Komárek M., 2010), (Pérez-García A., 2011), (Fisher M.C., 2018), (Davies C. R., 2021).

Следствием этого является необходимость, в увеличении как дозировок, так и количества обработок фунгицидными препаратами, что еще больше усугубляет уже нарушенный экологический баланс в почве и способствует дальнейшему загрязнению окружающей среды. В настоящий момент мировое сообщество столкнулось не только с проблемой увеличения вредоносности уже известных патогенов, но и с появлением новых опасных видов фитопатогенных микроорганизмов, зачастую относящихся к карантинным объектам. Распространение таких болезней, как фузариозы и ржавчина зерновых культур, фитофтороз картофеля, корневые гнили, бактериозы овощных и плодовых культур приводят к чрезвычайно высоким потерям урожая и снижению его качества.

Таким образом, преобладающая до недавнего времени химико-техногенная система интенсификации сельского хозяйства имеет серьезные недостатки. Глобальное или локальное изменение климата, истощение плодородия почвы совместно с общим ухудшением экологической ситуации в агроэкосистемах диктуют острую необходимость поиска качественно новых подходов к наращиванию производства сельскохозяйственной продукции. На сегодняшний день земледелие подошло к той границе, когда развитие экологически безопасного производства сельскохозяйственной продукции невозможно представить без активного внедрения микробиологических препаратов.

В связи с чем, принимая во внимание современное развитие производства сельскохозяйственной продукции, поиск оптимальных и экологически безопасных методов контроля фитопатогенных микроорганизмов становится чрезвычайно актуальным. В качестве решения указанной проблемы может стать применение биологических средств на основе микроорганизмов или их метаболитов (Pérez-García A., 2011), (Thambugala K. M., 2020). При этом биологические методы защиты имеют ряд ценных преимуществ, выгодно отличающих их от химических: безопасность для человека и животных, высокая эффективность и избирательность действия в отношении широкого спектра известных фитопатогенов, отсутствие к ним резистентности, короткий срок ожидания отклика, высокая экологическая безопасность. Тем не менее, эффективность применяемых биологических средств защиты во многих случаях оказывается значительно ниже, чем у химических.

Перспективным вариантом контроля за развитием заболеваний сельскохозяйственных растений является сочетание химических препаратов с биологически активными соединениями биотехнологического или растительного происхождения или их синтетических аналогов (Kim J.H., 2007), (Dzhavakhiya V., 2012), (Kim 2017), (Shcherbakova L., 2021). Противогрибной эффект, полученный в результате применения подобной комбинации, может быть аддитивным или синергетическим, что способствует значительному снижению рабочих концентраций пестицидов до значений, при которых они неэффективны (Campbell B. C., 2012), (Shcherbakova L., 2019).

В связи с чем, выявление биологически активных соединений, способных увеличивать эффективность современных коммерческих фунгицидов наряду со снижением их рабочих концентраций, является особенно актуальным.

### **1.3 Применение в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе грибов рода *Penicillium***

Среди штаммов, обладающих потенциалом применения в форме биопрепаратов, особое место принадлежит отдельным видам р. *Penicillium*,



синтезирующим разнообразные по своей структуре и спектру действия биологически активные вещества, что позволяет их использовать в интегрированных системах защиты растений (Cal A.De., 2009), (Ma H.-G., 2016), (Huber A., 2020), (Zhao X., 2021).

Примером использования грибов *Penicillium* в сельском хозяйстве может служить удобрение на основе биомассы *Penicillium citrinum* (МСС 0092) (рис.1). Это анаморфный мезофильный гриб, способный мобилизовать 50 кг/га марганца. Он используется в качестве эффективного почвенного инокулята.



Рисунок 1. Коммерческий препарат на основе *P. citrinum*, источник (Russian.alibaba.com)

Данное биоудобрение представляет собой растворимый порошок и содержит конидиоспоры *P. citrinum* ( $1 \times 10^8$  КОЕ/г). Он одобрен для использования в органическом сельском хозяйстве как препарат для улучшения усвоения марганца из почвы, что положительным образом сказывается на здоровье растений и почвы в целом.

Из данных литературы известен штамм *P. vermiculatum* Dang. РК – 1 (ВИЗР № 3), на основе которого создан биопрепарат для защиты подсолнечника от белой и серой гнили (патент СССР №1476891, 1987). Значительным недостатком штамма

являлось уменьшение его способности ингибировать рост и развитие *B. cinerea* и *S. sclerotiorum* в процессе хранения и многократных пересевов.

На основе штамм *P. vermiculatum* Dang РК-С, полученного методами селекции из *P. vermiculatum* Dang. РК-1 (ВИЗР № 3) и депонированного в коллекции чистых культур Всероссийского института защиты растений под номером ВИЗР-24 (Патент РФ 2322490, 2006), был разработан препарат Вермикулен. Активность данного биопрепарата, представляющего собой живую культуру гриба (споры и мицелиальная масса микроорганизма), была основана на следующих типах действия: конкуренцией, гиперпаразитизмом и антибиоогенезом.

Из данных патента CN 105899668В известен штамм-продуцент танзаваиново́й кислоты *Penicillium* sp. IBW F-104-06 (CN 105899668В, 2014). Для данного штамма, а также полученного на его основе биопрепарата продемонстрирована высокая противогрибная активность по отношению к достаточно обширному спектру фитопатогенных микроорганизмов.

#### **1.4 Антимикробные пептиды (АМП), общая характеристика и применение**

Согласно ряду литературных данных, среди разнообразных метаболитов, синтезируемых грибами рода *Penicillium* можно отдельно выделить вещества белковой природы (Nicoletti R., 2016).

АМП - это небольшие, преимущественно, катионные белки или пептиды, естественным образом вырабатываемые почти всеми живыми организмами и являющиеся первой линией защиты от микробных атак высших организмов. АМП присутствуют в бактериях, грибах, растениях, беспозвоночных (der Weerden, N.L.), (Wang G., 2016).

Они известны своей активностью широкого спектра действия против бактерий, грибов, вирусов, простейших и /или даже раковых клеток. Получены данные, согласно которым АМП могут вырабатываться микроорганизмами в качестве конкурентной стратегии для ограничения роста других микроорганизмов (Moretta A., 2021).

Согласно имеющимся литературным данным, механизм действия АМП достаточно широк (рис. 2), что имеет большое практическое значение при разработке препаратов на основе АМП. Установлено, что у грибов клеточная стенка играет ключевую роль в интернализации и активности нескольких АМП. Сообщалось, что различные АМП влияют на клеточную стенку грибов, ингибируя синтез  $\beta$ -глюкана или хитина и связываясь с маннопротеинами клеточной стенки чувствительных грибов (Buda De Cesare, G., 2020). АМП способны оказывать влияние и на такие процессы, как биосинтез вторичных метаболитов, в том числе микотоксинов. Данное свойство открывает перспективу их использования при выращивании сельскохозяйственных растений, а также послеуборочной обработки продукции при закладке ее на (Martinez-Culebras, 2021).

Обзор данных литературы показал, что выделенные из *P. chrysogenum* белки PAF и PAFB, имеющие небольшие молекулярные массы от 5.8 до 10 кДа, проявляют высокую ингибирующую активность в отношении широкого спектра патогенных грибов в микромолярных концентрациях и обладают противовирусным действием, не отягощенным цитотоксическим воздействием на клетки млекопитающих в *in vitro* и *in vivo* экспериментах (Huber A., 2020). Установлено, что биологическая активность данных белков основана на гиперполяризации плазматической мембраны, приводящей к нарушению, в конечном счете, клеточного гомеостаза. В результате активации ионных каналов и увеличении концентрации активных форм кислорода происходит апоптоз клетки (Huber A., 2020). Высокая стабильность PAF и PAFB при высоких температурах и в широком диапазоне pH делает их подходящими терапевтическими средствами для использования в медицине, защите растений и пищевых продуктов (Delgado J., 2015).

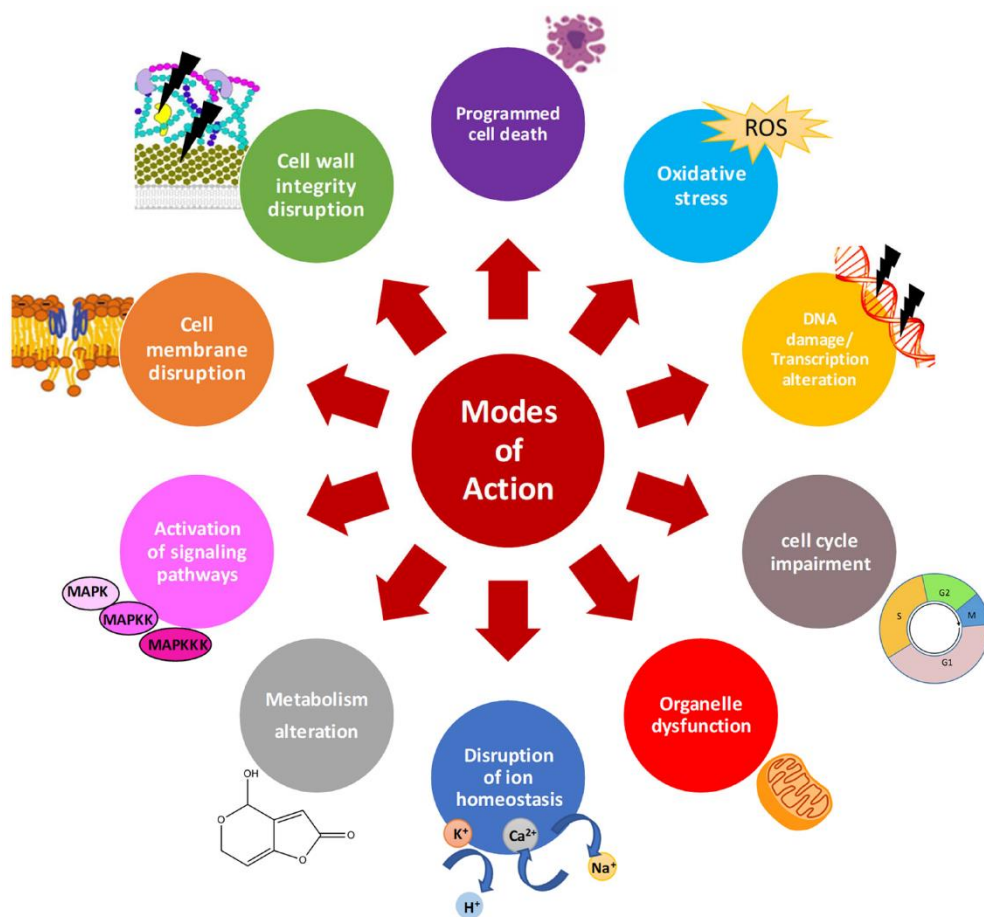


Рисунок 2. Общий механизм действия противогрибковых средств (Martinez-Culebras P. V., 2021)

Известен белок PgChP, продуцируемый штаммом *P. chrysogenum* AS51D, проявляющий противогрибную активность против токсигенных плесневых грибов, но имеющий высокую молекулярную массу 32-37 кДа. Определение его аминокислотной последовательности показало его высокую гомологичность с грибными хитозаназами. Препарат выделенного белка рекомендован для использования в качестве пищевого консерванта против токсигенных грибов и для получения хитозана для пищевых добавок и нутрицевтиков (Rodríguez-Martín A., 2010).

До настоящего времени не было отмечено крупномасштабного биотехнологического или терапевтического применения каких-либо малых катионных противогрибковых белков аскомицетов. Тем не менее, способность АМП

подавлять активность патогенных грибов человека и растений, а также ингибировать образование биопленки *Candida* позволяет их рассматривать в качестве перспективных биомолекул для создания новых стратегий противогрибкового лечения (Huber A., 2020). С помощью недавно разработанной системы экспрессии на основе *P. chrysogenum*, АМП могут секретироваться в большом количестве в супернатант легко ферментируемых плесневых грибов (Sonderegger C., 2016).

Секреция и накопление белков в культуральной жидкости грибов, выращенных в среде с минимальным содержанием минеральных веществ, обеспечивает возможность быстрой и недорогой очистки белка. Такая система также позволяет получать рекомбинантные варианты АМП с улучшенной эффективностью, создаваемые с помощью рационального дизайна (Sonderegger C., 2018).

Особенно перспективным может стать местное применение АМП для лечения поверхностных грибковых инфекций, вызванных *Candida* spp. или другими дерматофитами. При этом, согласно данным литературы, их комбинирование с лицензированными препаратами, такими как флуконазол, продемонстрировал высокую эффективность при подавлении роста *Microsporum* spp. и *Trichophyton* spp (Huber A., 2020).

Еще одним возможным способом применения может стать экспрессия АМП в трансгенных растениях для увеличения их устойчивости к патогенным микроорганизмам (Huber A., 2020).

### **1.5 Возможность применения препаратов на основе статинов для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных микроорганизмов**

Одна из эффективных стратегий борьбы с болезнями растений основана на контроле метаболических взаимоотношений в системе растение–патоген. Этого можно достичь с помощью соединений, которые изменяют или частично блокируют специфические пути биосинтеза в растениях или микроорганизмах, что

приводит к нарушениям трофических взаимоотношений патогенов с растениями-хозяевами или к образованию микробных метаболитов, связанных с патогенностью. Такой дисбаланс не обязательно может приводить к быстрой гибели патогенов, но способен привести к снижению их жизнеспособности или/и ухудшению их патогенных свойств. Аналогичные метаболические эффекты могут быть вызваны растительными ингибиторами грибковых и бактериальных протеаз, как описано выше, а также ингибиторами ферментов насекомых и нематод.

Статины – вторичные метаболиты микробного происхождения, относящиеся к группе поликетидов, – представляют собой еще один класс природных соединений, которые, как недавно было обнаружено, модулируют метаболические взаимодействия растений с патогенами. Метаболическим путем, на который нацелены статины, является биосинтез стеролов (Dubey N.K., 2010).

Хорошо известно, что стерины являются повсеместными и важными компонентами наружной мембраны и внутриклеточных мембран эукариотических организмов и играют важную роль в их физиологических функциях. Эти соединения необходимы для роста, развития и размножения патогенов растений. Ряд организмов, включая насекомых, нематод и оомицетов, не способен синтезировать стерины или даже их предшественники. Стерол-зависимые фитопатогены получают свободные стерины или промежуточные продукты их синтеза из растений-хозяев и, следовательно, могут контролироваться соединениями, вызывающими изменения в содержании, доступности или составе растительных стеринов.

Таким образом, была сформирована теоретическая предпосылка использования статинов для защиты растений от фитопатогенных грибов, насекомых-паразитов и нематод (Romanenko N.D., 2002).

В настоящее время доступен ряд химических фунгицидов класса триазолов (дифеноконазол, пропиконазол, тебуконазол и др.), которые ингибируют синтез эргостерина в грибах. Они тормозят формирование клеточных мембран, останавливая рост грибков, и подавляют спорогенез у некоторых фитопатогенных микроорганизмов. Статины являются естественными ингибиторами биосинтеза

стеринов, поэтому было сделано предположение, что представители данной группы соединений могут вызывать аналогичные эффекты. Было обнаружено, что статины продуцируются различными микроорганизмами, преимущественно нитевидными грибами. Они ингибируют фермент  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА-редуктазу (ГМГ-КоА-редуктазу) и предотвращают биосинтез стерола на уровне превращения ГМГ-КоА в мевалоновую кислоту. Статины широко применяются в медицине в качестве препаратов против атеросклеротических заболеваний, поскольку они эффективно снижают уровень холестерина в крови. Таким образом, биологическая совместимость и безопасность статинов хорошо доказаны.

Предположение об эффективности статинов в качестве ингибиторов роста и развития фитопатогенных микроорганизмов было подтверждено в ряде исследований (Dzhavakhiya V.V., 2008; Ukraintseva S.N., 2008) с использованием ловастатина и компактина, продуцентами которых являлись штаммы *Aspergillus terreus* 45–50 и *P. citrinum* 18-12, соответственно. В связи с тем, что сами статины являются водонерастворимыми веществами, в экспериментах использовали их натриевые соли.

В проведенных опытах *in vitro* было установлено, что добавление ловастатина к агаровой среде в диапазоне концентраций от 0.001% до 0.1% приводило к подавлению роста таких микроорганизмов, как *M. grisea*, *S. nodorum*, *Colletotrichum atramentarium*. Компактин же, в аналогичном диапазоне концентраций, способен останавливать рост *Cladosporium cucumerinum*, *S. nodorum*, *M. grisea* (Dubey N.K., 2010).

Кроме того, 0,001% раствор компактина значительно снижал прорастание спор у *S. nodorum*, в то время как 0,01% раствор полностью подавлял данный процесс. Среди протестированных растительных патогенов *M. grisea* (возбудитель пирикулярриоза риса) проявляет самую высокую чувствительность по отношению к обоим статинам; так, IC50 для ловастатина составляет ~0,003%. *S. nodorum* отличается высокой устойчивостью к ловастатину (IC50 0,02%); а *C. cucumerinum* демонстрирует тенденцию к устойчивости по отношению к компактину. Наряду с ингибированием роста грибковых микроорганизмов, присутствие статинов в среде

культивирования приводит к изменению окраса грибного мицелия во всех случаях, особенно ярко это выражено у *M. grisea* и *C. atramentarii* при воздействии на них ловастатина. Это наблюдение может быть связано с подавлением меланиногенеза в патогенных грибах. В рамках всех экспериментов концентрации статинов, приводящие к обесцвечиванию, были как минимум в десять раз меньше, чем концентрации, подавляющие рост (Dubey N.K., 2010).

Исследованные статины показали свойство предотвращать развитие болезней. Они способны задерживать и снижать развитие заболеваний на обработанных растениях в случае их нанесения до или во время инокуляции патогенами. Так, ловастатин и компактин проявили способность защищать пшеницу от заражения *S. nodorum*, а также табак от *A. longipes*. Кроме того, ловастатин показал защитное действие против *M. grisea* на рисе, в то время как компактин оказался эффективным против *Puccinia graminis* на пшенице и против *Phytophthora infestans* на картофеле. Фунгицидные и защитные действия оказались дозозависимыми. Однако фунгитоксичные концентрации также оказывали токсичное действие на растения, в то время как защита от заболеваний обеспечивалась значительно более низкими концентрациями без проявления фитотоксичности.

Хотя механизм защитного действия статинов требует дальнейшего изучения, проведенные полевые тесты на небольших площадях показывают, что они могут быть интересны в практическом отношении (Ukrainitseva S.N., 2008). Например, однократное замачивание картофельных клубней в 0,1%-ном растворе компактина в течение получаса задерживает появление признаков поражения растений фитофторозом примерно на месяц и замедляет развитие болезни. Только очень высокие концентрации статинов (0,5%) оказывают нежелательное воздействие на физиологию растений. К окончанию вегетационного сезона наблюдалось небольшое снижение заболеваемости фитофторозом на растениях из обработанных клубней, однако при этом на этих растениях было меньше пораженных клубней. Имеются основания полагать, что ловастатин и компактин проявляют и антивирусную активность (Ukrainitseva S.N., 2008).



Так, показано значительное снижение индекса поражения спорами *S. nodorum* заболеваемости после нанесения только 0,0005% раствора ловастатина на изолированные листья пшеницы. Применяемая концентрация не подавляла прорастание *S. nodorum* и его рост *in vitro*, но предотвращала развитие болезни с эффективностью защиты 94 и 72% через 3 и 7 дней после инокуляции, соответственно. Это может говорить о том, что защитный эффект статинов обусловлен механизмом, отличным от фунгицидной активности (Dzhavakhiya V.V., 2008).

Таким образом, дальнейшие исследования, направленные на понимание механизмов защитной активности статинов, могут способствовать их использованию в качестве биопестицидов в будущем. Ловастатин и компактин могут служить в качестве базовых молекул для создания активных аналогов посредством биохимической инженерии. Методы, используемые для исследования их защитных свойств, могут быть применены при скрининге других статинов и производных соединений, способных контролировать патогены. Такой скрининг может привести к открытию новых поликетид-содержащих природных веществ с высокой степенью защитной активности, которые при этом не будут оказывать негативного влияния на растения. Поскольку применение статиновых препаратов в сельском хозяйстве требует менее строгого уровня очистки, чем в фармакологической промышленности, использование простых методов выделения (Dzhavakhiya, 2008), а также штаммов-«суперпродуцентов» делает технологию статиновой защиты растений более экономичным и экологически безопасным подходом, чем использование химических пестицидов любого рода.

## **1.6 Получение высокопродуктивных штаммов методом мутагенеза и последующей селекцией**

### **1.6.1 Использование методов химического и физического мутагенеза**

Искусственно вызываемые наследственные изменения называют мутациями или мутационными изменениями. Они возникают под воздействием определенных факторов, которые называются мутагенами. Мутагены могут быть физическими, химическими или биологическими. Физические мутагены включают ультрафиолетовое излучение, ионизирующее излучение и высокую температуру. Химические мутагены включают химические соединения, такие как азотистая кислота и алкилирующие агенты. Биологические мутагены включают вирусы и бактерии, которые могут изменять генетический материал клетки (Ауэрбах Ш., 1978).

Для получения штаммов с высокой продуктивностью используется УФ-излучение, поскольку данный вид мутагенеза приводит к образованию максимального числа изменений (мутаций) у микроорганизмов.

УФ-лучи вызывают мутации в клетках, воздействуя на ДНК, изменяя ее структуру и функции. Это приводит к появлению новых признаков и свойств организма, включая его способность к размножению и росту.

В зависимости от направления изменений, выделяют прямые и обратные мутации. Прямые мутации приводят к изменению нормальных признаков. Обратные - к восстановлению дикого фенотипа.

При проведении физического мутагенеза, используют водную суспензию спор или клеток. Суспензию, содержащую клетки или споры, должна быть максимально однородной и не содержать каких-либо конгломератов, поскольку мутация в одной из клеток такого конгломерата может быть утрачена при прорастании на агаризованной среде. Как правило, для получения однородной суспензии используют фильтрацию и/или перемешивание на качалке. Однако

полностью избавиться от их присутствия в суспензии, обрабатываемой мутагеном, обычно не удается.

Доза воздействия физического мутагена определяется в единицах излучения, соответствующих используемому типу радиации. Выбор дозы мутагена зависит от степени выживаемости обрабатываемого микроорганизма, определяемой экспериментальным путем. Выживаемость рассчитывают по отношению числа колоний, выросших после мутагенного воздействия, к количеству колоний в контрольной пробе, выраженной в процентах. Чувствительность к летальному действию мутагена может значительно различаться у разных штаммов одного и того же вида микроорганизмов (Дьяков Ю.Т., 2005).

Примером успешного применения УФ-мутагенеза является получения высокопродуктивного по вирджиниамицину штамма *Streptomyces sp.* S 15-30 из коллекционного *Streptomyces sp.* DSM 40559 (Savushkin V.A., 2016). Как известно, антибиотик вирджиниамицин представляет собой смесь макроциклических компонентов, где основные - синергические факторы M1 и S1. Для максимальной активности вирджиниамицина необходимо присутствие 25-40% S1, которое увеличивает активность M1 в 3,5-4 раза. Однако, из-за множества генов, участвующих в биосинтезе вирджиниамицина, задача получения высокопродуктивных штаммов значительно затруднена. В результате проведенной работы продуктивность нового штамма без подбора оптимальных условий культивирования была увеличена в 7.4 раза с 0,35 г/л для родительского штамма до 2,59 г/л (Savushkin V.A., 2016).

Другой пример применения метода УФ-мутагенеза и последующей селекции – получение штамма-продуцента эремомицина *A. orientalis* E 13-26 из *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ Ас-1125. В результате проведенного процесса мутагенеза, селекции и подбора условий культивирования продуктивность нового штамма составила  $3.42 \pm 0,17$  г/л, что практически в 7 превышает аналогичный показатель родительского штамма (Джавахи В.В., 2017).

### **1.6.2 Способ отбора спонтанных мутаций**

Алгоритм отбора колоний при спонтанных мутациях состоит из нескольких этапов. Сначала исходная культура подвергается воздействию мутагенного фактора в нескольких дозах. Далее выбирают изоляты, выросшие после воздействия каждой дозы мутагена, морфологически отличающиеся от контрольных. Затем, производится оценка продуктивности целевого вещества каждой отдельной колонии. Определяется процентное соотношение морфологически измененных вариантов по отношению к контрольным для определения оптимальной дозы мутагенного фактора (Ауэрбах Ш., 1978).

### **1.6.3 Отбор мутантов на основе изменения морфологического признака**

Данный вид отбора основан на корреляции изменения морфологических признаков у высокопродуктивных штаммов. Эти штаммы могут иметь повышенную споруляцию или, наоборот, ее терять. Может происходить изменение формы и цвета колоний. Поэтому, после мутагенного воздействия, в-первую очередь, отбирают морфологически измененные и проверяют их продуктивность (Дьяков Ю.Т., 2005).

Так, например, штамм *Penicillium* был усовершенствован с помощью физического (ультрафиолетового (UV)) и химического (этилметансульфоната (EMS)) воздействия для достижения максимальной выработки алкалоидов методом поверхностной ферментации культуры. Выживаемость штамма *P. citrinum* при обработке ультрафиолетом и EMS, была на уровне 2,04% (Shahid MG., 2020).

### **1.7 Условия культивирования штаммов-продуцентов**

Поскольку основой любого биопрепарата являются живые клетки микроорганизмов, особое значение на этапе производства отводится условиям культивирования биоагента и составу питательной среды. Известно влияние

температуры на скорость и направление метаболизма, потребность в углероде и/или азоте. Значение кислотности культуральной жидкости также способно определить конечный выход целевого продукта (Перт С. Д., 1978; Мосичев М.С., 1982; Diaz de Velegas M., 2005; Kim M.H., 2006).

При оптимизации условий культивирования особое внимание уделяется подбору компонентов, их качественному и количественному составу, с целью обеспечения быстрого роста и развитие микроорганизмов. При этом, при определении состава питательных сред экономические аспекты могут оказывать определяющее значение, так как конкретные технико-экономические показатели влияют на возможность производства препарата в промышленном масштабе (Glare T., 2012; Khater H.F., 2012; Gašić S., 2013).

При разработке новых питательных сред необходимо проводить обширные исследования для выбора оптимальной питательной среды и улучшения ее качественных и количественных характеристик. Это делается для того, чтобы получить наилучший результат при использовании данной среды.

Основная задача, решаемая учеными в процессе оптимизации условий роста микроорганизмов, - это необходимость замены дорогих компонентов питательной среды более доступными. При сравнении препаратов с одинаковыми характеристиками и назначением, предпочтение, вероятно, будет отдано варианту с менее дорогой питательной средой, состоящей из доступных компонентов.

Очень важно определить минимальное количество каждого компонента в питательной среде, необходимое для получения одинакового количества целевого продукта за то же время. Это касается наиболее дорогих компонентов, таких как некоторые углеводы и аминокислоты.

Процесс приготовления питательных сред должен быть строго контролируемым и воспроизводимым, чтобы в каждой последующей серии экспериментов с определенной вероятностью получать среды с заданными характеристиками (Матвеев В. Е., 1985).

Процессы выращивания микроорганизмов можно оптимизировать с помощью методов, которые делятся на две группы.

Первая группа включает классические методы оптимизации на основе экспериментальных данных. Они не требуют сложных математических расчетов, но требуют значительных затрат времени из-за необходимости проведения множества экспериментальных исследований. Часто эти методы используются на первых этапах разработки питательных сред для определения основных регулирующих компонентов и их активных уровней.

Вторая группа включает методы с использованием математических моделей. Эти методы основаны на создании математической зависимости (уравнения регрессии) для ограниченных процессов с использованием классического метода экспериментального планирования Бокса-Уилсона. Преимущество математического планирования состоит в возможности одновременной оценки влияния на результативность процесса нескольких факторов. Помимо этого, метод позволяет выполнить количественную оценку каждого отдельного фактора и степень его влияния, установить наличие в системе взаимодействий между факторами, а также определить значения параметров при максимальной эффективности процессов (Меледина Т.В., 2015).

Совместное использование классических методов оптимизации и современных методов математического моделирования позволяет достичь высоких результатов в процессе разработки питательных сред.

### **1.7.1 Источники углерода**

Углеводы являются одним из ключевых компонентов питательной среды, необходимой для выращивания микроорганизмов.

Обмен углеводов служит для обеспечения трех основных функций в клетке: получение энергии, производство предшественников для других биосинтетических процессов и создание окислительно-восстановительной среды для преобразования этих предшественников в промежуточные и конечные продукты, необходимые для функционирования клетки (Квеситадзе Г. И., 2002).

В качестве источника углерода грибы используют разнообразные органические соединения, включая углеводы (сахара и их производные), спирты, органические кислоты, жиры, пептиды и белковые молекулы.

Некоторые виды грибов обладают специфическими предпочтениями в отношении источников углерода. Например, некоторые виды лучше используют глюкозу, в то время как другие предпочитают фруктозу или пентозы.

Эффективность использования грибами различных соединений в качестве источников углерода определяется по различным параметрам, включая скорость роста мицелия, уровень спороношения или скорость образования определенных метаболитов. При использовании более эффективных источников углерода лаг-фаза роста культуры, как правило, короче или отсутствует, и культура достигает максимальной массы мицелия за более короткий период времени (Билай В.И., 1989).

Для *P. citrinum* используются такие источники углерода, как глюкоза, глицерин, мальтоза, декстрин, крахмал, лактоза, сахароза, меласса и соевое масло. Добавление сахара в питательную среду при выращивании гриба устраняет необходимость в промежуточных преобразованиях, и клеточная энергия используется непосредственно для его усвоения. По этой причине сахара считаются одним из самых эффективных органических субстратов.

Влияние количества вносимой глюкозы на биосинтез сурфактина было показано в исследовании Ghribi. Было установлено, что увеличение концентрации глюкозы с 40 до 45 г/л привело к ингибированию биосинтеза сурфактина с  $720 \pm 7$  мг/л до  $690 \pm 6$  мг/л соответственно (Ghribi D., 2011). Это снижение может быть связано с тем, что высокие концентрации глюкозы (50-60 г/л) могут привести к ее избытку в среде, снижению pH и, следовательно, уменьшению выработки сурфактина *B. subtilis* (Chen W. C., 2015). Эти результаты согласуются с многочисленными исследованиями, которые показали, что существует оптимальный уровень насыщения среды питательными веществами, превышение которого может быстро привести к подавлению роста культуры из-за накопления продуктов ее жизнедеятельности в среде (Lee S. Y., 1996).

Исследование Н.Ю. Шарова продемонстрировало, что  $\beta$ -глюканы в биомассе штаммов *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 преимущественно образуются при культивировании на сахарозо-минеральной среде, содержащей дисахарид сахарозу (Шарова Н. Ю., 2020).

Dogsa, Brložnik изучили влияния сахарозы на толщину и плотность биопленок, формируемых *B. subtilis*. Установлено, что на среде, содержащей значительное количество сахарозы, исследуемые штаммы образуют биопленки, толщина которых может достигать 140 мкм, что в десятки раз превышает толщину бактериальных пленок на средах с меньшей концентрацией указанного компонента. Помимо этого, образующиеся на обогащенных сахарозой средах биопленки более складчатые и прочные. Данный факт свидетельствует о корреляции механической прочности бактериальных биопленок и концентрации сахарозы (Dogsa I., 2013). Согласно другим данным, замена глюкозы на сахарозу в питательной среде для культивирования штамма *B. methylotrophicus* ВМ47 способствовала увеличению антигрибковой активности исследуемого штамма по отношению к *F. oxysporum* в 3 раза (Tumbariski Y., 2015).

### 1.7.2 Источники азота

Метаболизм источников азота обеспечивает синтез белков, нуклеиновых кислот, и компонентов клеточной стенки грибов. Азот в грибковых клетках может составлять до 10% от сухого веса мицелия (Hernández С.А., 2015).

В качестве источника азота грибы используют как неорганические соединения, такие как нитраты и аммиак, так и органические соединения, такие как белки, пептиды и аминокислоты. Нитраты являются щелочными, поскольку гриб поглощает катионы ( $\text{NO}_3^-$ ), оставляя в среде анионы ( $\text{K}^+$  или  $\text{Na}^+$ ). Аммиак является кислым, так как гриб поглощает анионы ( $\text{NH}_4^+$ ), оставляя катионы.

В промышленном производстве биопрепаратов в качестве источника азота используют продукты растительного или животного происхождения (Moghannem S. A., 2018). Эти продукты обычно представляют собой гидролизаты или



автолизаты, богатые витаминами, минералами и органическим азотом (Щербаков М.Г., 2014).

При этом, следет учитывать, что при выборе в качестве источника органического азота, например, муки (соевая, гороховая и др.) или кукурузного экстракта, следует учитывать, что их влияние на направление биосинтеза целевого вещества будет определяется не только наличием белков и аминокислот. Также важно присутствие углеводов, нуклеиновых кислот, жиров, минералов, органических кислот и других соединений.

В исследовании Ю. А. Буровой по оптимизации среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* 2006, проведенном в 2012 году, было отмечено, что нитратная форма азота в концентрации 2 г/л способствовало увеличению роста биомассы на 12,5 г/л, а титр активных клеток составил в среднем от  $10^9$  до  $10^{10}$  КОЕ/мл. Использование аммонийного азота привело к снижению прироста биомассы в среднем на 9,5% по сравнению с предыдущим вариантом. В варианте с нитратом аммония максимальный прирост биомассы был достигнут при концентрации 2 г/л и составил 11,4 г/л (Бурова Ю.А., 2006).

Некоторые бактерии, которым требуется внесение аминокислот, лучше растут при добавлении одной или нескольких аминокислот в форме пептидов в среду. Например, добавление DL-метионина в концентрации 4 г/л к среде для культивирования штамма *B. circulans*, выделенного из ризосферы люцерны, увеличивает выработку цефалоспоринона С, обладающего сильным антибактериальным действием (Abada E. A., 2014). Внесение в питательную среду для выращивания *B. subtilis* L2L-аспарагиновой кислоты, L-глутаминовой кислоты и L-пролиновой кислоты способствует увеличению синтеза турина А на 32.81% в сравнении с контрольным образцом (Yue H., 2021).

Из данных, полученных Широких И.Г. с соват. следует, что скорость роста и целлюлазная активность двух выделенных из почвы штаммов *Streptomyces* sp. коррелировали с используемым в ростовой среде источником органического или минерального азота. Установлено, что для продукции целлюлаз предпочтительнее неорганические соли –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , а для оптимального накопления

биомассы лучшими источниками азота являлись пептон и гидролизат казеина (Широких И.Г., 2021).

Митишевым А.В. с соавт. также установлено, что добавление в качестве источника азота водного экстракта льняного жмыха значительно увеличивало количество клеток хлореллы до  $8,12 \cdot 10^6$  КОЕ/мл на 10-е сутки выращивания и содержание белка в биомассе до 64,61 %. В то время, как наличие аммония сульфата в среде приводило к медленному росту плотности клеток хлореллы и низкому содержанию белка в биомассе глубинной культуры (Митишевым А.В., 2019).

Таким образом, выбор альтернативных источников азотного питания может помочь не только улучшить качество биопрепаратов, производимых микроорганизмами, но и снизить затраты на производство в промышленных условиях за счет увеличения производительности.

### **1.7.3 Минеральные элементы**

Минералы, полученные из микроорганизмов, обнаруживаются в золе, оставшейся после сжигания их клеток. Наиболее распространенные минералы включают макро – (P, K, Na, S, Fe, Ca, Mg ) и микроэлементы (Zn, Cu, Co, и др). Эти минералы играют важную роль в регулировании осмотического давления, кислотности среды, активности ферментов и формировании структурных компонентов клетки микроорганизма.

## **1.8 Организация и проведение биотехнологических процессов**

### **1.8.1 Определение ключевых параметров биотехнологического процесса**

Использование герметичного оборудования для выращивания различных биологических образцов является ключевым условием для успешного протекания процесса и получения высококачественного продукта. Выбор материала для

оборудования также имеет большое значение, так как биологические системы могут быть чувствительны к ингибированию или активации различными веществами. Современное биотехнологическое оборудование оптимизировано для проведения непрерывных процессов, поскольку они характеризуются высокой производительностью, автоматизацией практически всех этапов биотехнологического производства и относительно низкими экономическими затратами. Следует отметить, что микробиологические процессы, используемые в биотехнологии для производства широко круга биологически активных веществ, имеют много общего.

В биореакторах ферментационные процессы ведутся в водной среде при постоянном перемешивании, подаче газа и регуляции таких параметров, как концентрация растворенного кислорода, pH и температура. Поэтому, в связи тем, что все биотехнологические процессы состоят из одинаковых основных этапов, включающих приготовления питательных сред, проведение процесса ферментации и выделение конечных продуктов, разработаны универсальные установки для производства разнообразных биотехнологических продуктов без необходимости перенастройки и изменения оборудования. Исходя из этого, биотехнологическое производство может состоять из типовых модулей для выполнения стандартных процессов.

Несмотря на то, что каждое конкретное микробиологическое производство может иметь свои особенности на разных этапах процесса, общая технологическая схема биотехнологического производства остается неизменной. Процесс микробиологического синтеза обычно включает пять основных этапов:

1. Приготовление питательной среды.

При этом, для каждой культуры необходим индивидуальный подбор компонентов питательной среды, необходимых для роста микробной массы и биосинтеза целевых продуктов.

2. Поддержание чистой культуры.

Данный этап является необходимым условием для обеспечения получения целевого продукта с заданными характеристиками.

### 3. Проведение процесса ферментации в биореакторе.

Во время этого этапа происходит образование целевого продукта. При этом, целевым продуктом может быть либо сама биомасса, получаемая в результате культивирования, либо метаболиты, образуемые в процессе роста и развития микроорганизмов.

### 4. Выделение и очистка конечных продуктов.

В данном случае, необходимо разделять смеси веществ с очень похожими свойствами, находящиеся в растворах. В случае, если целевой продукт представляет собой продукт жизнедеятельности микроорганизма, то необходимо упростить процесс отделения биомассы от культуральной жидкости. Для каждого конкретного случая получения конечного продукта используются свои методы: ультрафильтрация, центрифугирование, лиофилизация и т. д. Это связано с низкой устойчивостью конечных продуктов к хранению, так как они представляют собой идеальную среду для развития посторонних микроорганизмов.

### 5. Фасовка готовых форм продуктов.

Биоинженерия занимается техническим обеспечением биотехнологических процессов. Разнообразие процессов обусловлено разнообразием используемого биотехнологического оборудования. Наиболее специфично оборудование для стадии ферментации, так как эта стадия является основной. С технической точки зрения, наиболее трудоемким является процесс аэробной глубинной стерильной и непрерывной (или с подпиткой субстратом) ферментации, в то время как ферментеры для поверхностной и анаэробной ферментации технически проще и менее энергозатратны.

Таким образом, существующие многообразие конструктивных решений обусловлено следующими факторами:

- используемый продуцент;
- питательная среда;
- масштаб производства;
- физические и химические свойства получаемого продукта и отходов.

Основная схема организации биотехнологического процесса представлена на рисунке 3.

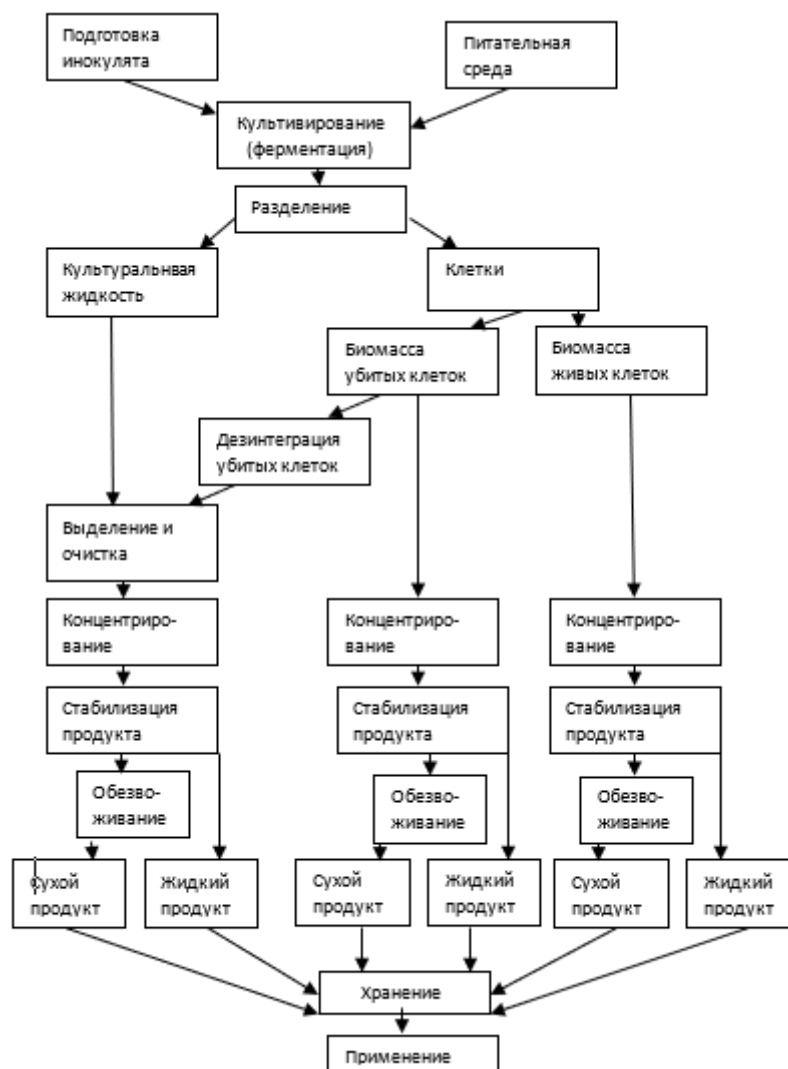


Рисунок 3. Схема биотехнологической производственной системы

### 1.8.2 Используемое в биотехнологическом производстве ферментационное оборудование

На сегодняшний день существует множество различных типов ферментационных аппаратов, включая те, которые обеспечивают перемешивание, аэрацию, барботаж и другие функции (Алексеев Г.В., 2015), (Liu S., 2013), (Sonawane S.H., 2015), (Sharma K.R., 2015). В соответствии с классификацией

Виестура, эти ферментационные аппараты можно разделить на три основных типа в зависимости от источника энергии: газовые, жидкостные и комбинированные (Виестура У.Э., 1987).

В последние годы были разработаны и запатентованы различные конструкции биореакторов, включая:

1. Реактор для культивирования микроводорослей.

Данная конструкция включает в себя герметичную емкость, имеющую форму осесимметричного тела вращения и содержащую внутри себя другую соосную цилиндрическую часть. На поверхности этой емкости располагается источник фотосинтетически активной радиации. Это может быть, например, набор сверхмощных светодиодов. Также в состав устройства входят штуцеры для газовых и жидкостных потоков, которые используются для установки различных датчиков и систем контроля. Внутри емкости установлено устройство для перемешивания суспензии микроводорослей, которое может создавать закрученный поток газа над поверхностью суспензии. Скорость этого вихря увеличивается от центра к периферии емкости. В центральной части емкости поток газа имеет осевой противоток. Разница давлений между центром и периферией вихря позволяет поддерживать стабильную циркуляцию газа (Мурашко А. С., 2013), (Табала К. Б., 2013), (Мурашко С.П., 2013).

2. Оборудование для культивирования микроорганизмов.

Ферментер представляет собой горизонтальную трубчатую емкость, снабженную барботером, теплообменником и перемешивающим устройством культурной жидкости. Каждое устройство снабжено корпусом, соединенным с ферментационной емкостью. Также имеется циркуляционный контур, который используется для аэрирования газа и культурной жидкости, состоящий из трубопроводов, смеси газа и жидкости, сменяемого сопла и расходомера для газа. Ферментационная емкость изготовлена из прозрачного и термостойкого стекла. По бокам емкости установлены защитные экраны из перфорированного и водоотталкивающего материала. Такой аппарат обеспечивает эффективный массообмен за счет равномерного распределения газа в объеме культурной

жидкости. Он может использоваться в различных отраслях промышленности и для исследовательских целей (Редикульцев Ю.В., 2005).

3. Устройство, предназначенное для увеличения скорости размножения клеток в суспензии или других культивируемых организмах. Оно работает на основе природного отбора, который позволяет ускорить размножение клеток и увеличить их выход.

Аппарат состоит из гибкого стерильного трубопровода с питательной средой. С помощью системы зажимов трубопровод разделяется на несколько зон: отработанная культуральная жидкость (ниже по потоку), растущая культура (камера роста) и питательная среда для культивирования (выше по потоку). Также в устройстве есть механизм для перемещения зажимов и трубопровода, чтобы часть камеры роста с культурой можно было изолировать от остальной части камеры. Это позволяет соединить часть трубопровода с неиспользованной средой и часть культуры, уже находящейся в камере роста. Во время работы аппарата этот способ обеспечивает более высокую производительность размножения клеток или культивируемых организмов (Де Креси Юд Ф.М., 2009).

4. Биореактор для получения биогаза.

Данный аппарат представляет собой вертикальный цилиндрический резервуар с герметичной крышкой, установленный на опорах. В резервуаре имеются загрузочный и разгрузочный патрубки, а также патрубок для отвода биогаза. Днище резервуара выполнено в форме усеченного конуса и оснащено нагревательной лентой. Весь резервуар обмотан такой же нагревательной лентой. Внутри резервуара находится перемешивающее устройство в виде трехъярусной лопастной мешалки. Верхние лопасти мешалки расположены перпендикулярно оси вала и снабжены направленными вниз дополнительными лопастями. Средние и нижние лопасти имеют форму днища резервуара и имеют направленные вверх лопасти. Количество лопаток на нижних лопастях может варьироваться от трех и более. Данный биореактор предназначен для проведения различных процессов ферментации (Ямпиллов С.С., 2015).

### 1.8.3 Оборудование, предназначенное для отделения промежуточных полупродуктов от конечного целевого продукта

Метод выделения целевого продукта зависит от его локализации: в клетке, культуральной жидкости или же продуктом является микробная масса (Roger G.H., 2015). Технически сложным является выделение продукта из клетки, поскольку данный процесс включает следующие этапы: отделение биомассы от культуральной жидкости, разрушение клеточной стенки и отделение целевого продукта от клеточных компонентов.

На первом этапе для разделения культуральной жидкости на биомассу и фильтрат используют следующие методы:

1. флотация (если клетки продуцента из-за низкой смачиваемости скапливаются на поверхности жидкости).

2. фильтрация. Эта установка предназначена для использования в биотехнологическом производстве бутилового спирта путем сбраживания сахаров. Она отделяет лигнин от биотехнологических растворов, которые могут содержать сахара, растительные остатки, грибки и другие посторонние вещества (Акопян В.Б., 2012)).

3. центрифугирование.

Центрифугирование и фильтрация иногда используются в сочетании друг с другом. С этой целью возможно использование фильтрационных центрифуг. Также возможно использование центрифуг, в которых разделение жидкой и твёрдой фаз не связано с фильтрацией, и основано исключительно на центробежной силе.

На втором этапе для разрушения клеток используют физические, химические и химико-ферментативные методы.

Разрушение клеточной стенки с использованием физических методов имеет наибольшее практическое значение (Акопян В. Б., 2011, Акопян В. Б., 2012, Складнев Д. А., 2011, Складнев Д. А., 2011). Данный процесс может быть осуществлен с помощью:

– ультразвука



- вибрационным методом;
- встряхиванием со стеклянными бусинами;
- использованием высокого давления;
- разрушением замороженных клеток;
- растиранием в фарфоровой ступке;
- использования осмотического шока;
- сжатием клеточной массы и снижением давления.

Третий этап включает разделение целевого вещества и клеточных фрагментов. Здесь используются методы, аналогичные разделению клеток, но с применением высокоскоростных центрифуг и фильтров с меньшими размерами пор (часто мембранные). Выделение целевого продукта из культуральной среды или клеточных гомогенатов осуществляется путем его осаждения, экстракции или адсорбции. Современные методы разделения веществ включают хроматографию, электрофорез, ионообменную хроматографию, изотахофоретическое разделение, электрофокусировку и другие методы, основанные на принципах экстракции и адсорбции ( Шарипова Р. У., 2016).

В качестве примеров можно привести следующие способы:

1. Новый метод разделения и выделения белков плазмы человека с использованием кольцевой хроматографии. Отличительной особенностью этого метода является использование среды с аппликационным слоем в виде сферических частиц с гидрофобной поверхностью для проведения разделения (Бухахер А., 2003 год).

2. Способ очистки вирусов, полученных *in cell culture*, включает отделение вирусов с помощью ионообменной хроматографии от белков и ДНК клеток. Он также включает по меньшей мере одну стадию анионной хроматографии и одну стадию катионной хроматографии (Фанже Б., 2001).

#### 1.8.4 Стабилизация целевых материалов

Проблема сохранения биологических материалов возникла в самом начале биологической науки. Большинство биологических материалов сохраняются при обычных условиях в течение всего нескольких дней. В связи с этим были разработаны различные методы консервации биологических образцов (Акопян В.Б., 2012). Эти методы можно разделить на следующие категории:

- консервация при положительной температуре с использованием химических веществ (хлороформа, фенола, глицерина, формалина и т. д.);
- замораживание гигроскопических материалов при низких температурах в вакууме (лиофильная сушка);
- сушка является одним из самых эффективных методов стабилизации свойств биологических (растительных, животных, микробиологических) продуктов. Этот метод позволяет сохранять продукты при обычных условиях в течение длительного времени. Кроме того, после сушки масса продукта значительно уменьшается, что снижает транспортные расходы и стоимость упаковки.

## Заключение

Таким образом, основываясь на обзоре литературных данных, можно сделать вывод, что ключевыми вопросами при практической реализации способа защиты сельскохозяйственных растений с использованием методов биотехнологии являются: выбор «агента» (действующего начала биопрепарата), обоснование механизма взаимодействия с фитопатогенными микроорганизмами и окружающей средой, способы производства и форма препарата, позволяющая эффективно применять биометоды в регуляции фитопатогенных микроорганизмов. Согласно литературным данным, биопрепараты на основе грибов рода *Penicillium* могут быть эффективными для использования в разработке схем защиты сельскохозяйственных растений, позволяющих снизить пестицидную нагрузку на биоценозы и здоровье человека в целом. В связи с этим, разработка технологии получения биопрепарата на основе штамма *P. chrysogenum* является актуальной задачей, на решение которой была нацелена данная диссертационная работа.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы исследований

#### 2.1.1 Химические реактивы, использованные в данной работе

Информация о производителях химреактивов представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Химические реактивы и материалы

Название реактивов	Фирма-производитель или поставщик
Картофельный декстрозный агар (КГА).	(Condalab, Madrid, Spain)
Агар-агар	«Difco», (США)
Метанол	(Merck)
Стандартный образец мевастатина	(Sigma-Aldrich, 95 %)
Глюкоза	Acros Organics (Бельгия)
Мясной пептон	HiMedia Laboratories (Индия)
Триптон	«Difco», Germany
Мука соевая обезжиренная Соянта 200 СТ	ООО «Иркутский масложиркомбинат
Сухое обезжиренное молоко	ОАО «Бабушкина крынка» Беларусь
Сахар пищевой	ГОСТ 33222-2015
Сахароза Этилацетат Глицерин NaNO <sub>3</sub> MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Химикаты российских производителей марок осч, хч и чда
Азоксистробин 250 г/л, Тебуконазол 250 г/л, Пропиконазол 250г/л Пикоксистробин 200г/л,+ ципроконазол 80г/л	Химические фунгициды: Квадрис , Сингента Фоликур, Байер Тилт, Сингента Аканто + ДюПон Химпром

## 2.1.2 Микроорганизмы, использованные в работе

- Штамм *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D получен из рабочей коллекции лаборатории биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН.
- Штаммы *Fusarium oxysporum* МР-14-6, *Alternaria solani* 10053, *Botrytis cinerea* 1000007 предоставлены Центром коллективного пользования «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ).
- Штамм *Sclerotinia sclerotiorum* выделен сотрудниками группы биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН из образцов моркови (сорт «Олимпо», Россия). Штамм идентифицирован в лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП) ФИЦ Биотехнологии РАН.

## 2.1.3 Среды и условия культивирования

### 2.1.3.1 Состав сред для поддержания микроорганизмов

Штамм *P. chrysogenum* поддерживали на среде следующего состава (г/л): агар - 20, глюкоза - 30, глицерин - 70, соевая мука - 10, мясной пептон - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1, pH = 6,3-6,5.

Для поддержания штаммов фитопатогенных микроорганизмов использовали агаризованную картофельную среду с глюкозой (PDA).

Штаммы на среде PDA поддерживали в течение 1 месяца при температуре 4 °С, затем пересеивались на свежие агаризованные среды. Хранили штаммы при температуре (-70 °С) в 50% растворе глицерина.

### 2.1.3.2 Приготовление питательных сред

Для культивирования посевной культуры *P. chrysogenum* в колбах использовали базовую вегетативную среду следующего состава (г/л): сахароза - 100, мука соевая - 20, гидролизат казеина - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1, вода дистиллированная до 1 л, рН = 6,3-6,5.

Среду разливали в колбы объемом 100 мл по 20 мл в каждую для выращивания 1 генерации (маточная колба) и по 100 мл в колбы емкостью 500 – 750 мл для 2 генерации (рабочая партия колб). Среду в колбах стерилизовали в автоклаве при давлении 0,8 кгс/см<sup>2</sup> в течение 40 минут и затем выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 2 – 3 суток. Среда должна оставаться прозрачной. В случае помутнения одной или нескольких колб всю партию среды браковали.

Исходная ферментационная среда для культивирования штамма *P. chrysogenum* в ферментере имела следующий состав (г/л): сахароза - 200, мука соевая - 30, гидролизат казеина - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1, вода дистиллированная до 1 л, рН = 6,3-6,5.

Среду стерилизовали в ферментере при давлении 1 атм. в течение 1 часа и выдерживали при температуре 37 °С, перемешивании со скоростью 200 об/мин и расходе воздуха 0,2-0,3 л/мин в течение 24 часов.

Приготовление оптимизированной ферментационной среды для культивирования штамма *P. chrysogenum* в ферментере следующего состава (г/л): сахар - 100, мука соевая - 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1, вода дистиллированная до 1 л, рН = 6,3-6,5.

Среду стерилизовали в ферментере при давлении 1 атм. в течение 1 часа и выдерживали при температуре 37 °С, перемешивании со скоростью 200 об/мин и расходе воздуха 0,2-0,3 л/мин в течение 24 часов.

### **2.1.3.3 Приготовление картофельно-глюкозного агара (КГА)**

В состав КГА входят (г/л): картофель – 200, глюкоза – 20, агар – 20, водопроводная вода до 1 л. Очищенный картофель варили в водопроводной воде, полученный бульон фильтровали через марлю, добавляли глюкозу. рН среды естественный. Полученный картофельно–глюкозный бульон переливали в колбу с агаром объемом 1 л, закрывали ватно-марлевой пробкой и автоклавировали при давлении 1 атм в течение 30 минут. Полученную среду разливали в стерильные чашки Петри или 25 мл пробирки с ватными пробками.

В эксперименте, описанном в пункте 2.2.4 использовали жидкую картофельно-глюкозную среду, вышеуказанного состава без добавления агара.

### **2.1.3.4 Культивирование микроорганизмов на твердой агаризованной среде**

В пробирку с культурой добавляли 10 мл стерильной водопроводной воды и микробиологической петлей осторожно снимали верхний спорный слой. Затем, 0.1 мл полученной споровой суспензии (концентрация спор -  $1 \times 10^7$ ) в переносили в чашки Петри или пробирки с агаризованной средой и равномерно распределяли по всей поверхности агара. Температура выращивания грибных штаммов составляла 24<sup>0</sup>С. Продолжительность культивирования на твердой агаризованной среде определялась родовой принадлежностью гриба.

### **2.1.4 Ферментационные установки для культивирования штамма *P. chrysogenum***

Разработку технологии культивирования штамма *P. chrysogenum* проводили на ферментационных установках №1, №2 и №3, состоящих из ферментеров объемом 15, 100 и 1000 л, соответственно.

#### 2.1.4.1 Описание ферментационной установки №1

Ферментационное оборудование номер один включало в себя 15-литровый ферментер (рис. 4) рабочим объемом 10-12 литров с блоком автоматического управления процессом с помощью компьютера.. Процесс практически полностью автоматизирован. Это позволяет точно измерять и контролировать заданные параметры ферментации в режиме реального времени. Ферментер оснащен водяной рубашкой для подачи охлаждаемой воды и стерилизации. Дистиллированная вода поступала из централизованной системы охлаждения, подключенной к оборудованию (Lauda WK-3200 с рабочим диапазоном температур от 0 до + 40°C, АДЭ-25 с производительностью 25 л/ч и мощностью 18 кВт). Стерилизацию паром обеспечивали через электропаровой генератор (ЭПГ-80 от ООО НПП “Теплотехника”). Ферментер снабжен нагревателями для поддержания заданного температурного диапазона в процессе стерилизации и культивирования. Измерение температуры производится датчиком (ДТС-105), встроенным в ферментер. Измерение уровня водородного показателя производится с помощью рН электрода (Mettler Toledo). Значение водородного показателя регулировали добавлением кислоты или основания при выходе за пределы заданного диапазона. Кислоту и основание подавали с помощью перистальтических насосов. Измерение концентрации растворенного кислорода выполняли с использованием рO<sub>2</sub>-электрода (Mettler Toledo). Перемешивание осуществлялось с помощью механического перемешивающего устройства (мешалка с герметичным торцевым уплотнением, трехъярусная турбинная Раштон) для равномерного перемешивания среды по всему объему.





Рисунок 4. Ферментационная установка №1

#### 2.1.4.2 Описание ферментационной установки №2

Ферментационное буродование № 2 состояло из ферментеров, геометрическим объемом 100 литров (Рис. 5). Ферментеры подключены к источникам пара, сжатого воздуха, воды и блоку автоматического управления.

Эффективный объем ферментеров составлял от 60 до 70 литров. Они оснащены рубашкой для охлаждения и стерилизации водяным паром. Температуру контролировал встроенный в ферментеры датчик температуры. Значение водородного показателя измеряли с помощью рН-электрода. рН регулировали добавлением кислоты или основания в случае выхода за пределы установленных программой значений. Кислоту и основание подавали перистальтическим насосом. Концентрацию растворенного кислорода измеряли с помощью рО<sub>2</sub>-электрода. Перемешивание осуществлялось с помощью механического перемешивающего устройства (мешалка с герметичным торцевым уплотнением, трехъярусная

турбинная Раштон) для равномерного перемешивания среды по всему объему. Значение растворенного кислорода регулировали изменением объема сжатого воздуха и изменением оборотов мешалки. . Стерилизацию пустых ферментеров осуществляли острым паром при температурах  $124 \pm 1$  °С и давлении 0.1 - 0.15 МПа в течение одного часа. После стерилизации конденсат сливали, ферментер разбирали, мыли и тщательно промывали все “глухие” участки. Затем проводили внутренний осмотр аппарата и проверяли работу механического перемешивающего устройства. Стерилизацию питательной среды для ферментации проводили непосредственно в ферментере. После стерилизации устанавливали расход воздуха по ротаметру 20 л/мин , давление 0,04 МПа и содержание растворенного кислорода 100% в среде. После охлаждения до 25° С, из ферментера отбирали стерильную пробу питательной среды для контроля по биохимическим и микробиологическим показателям.



Рисунок 5. Ферментационная установка №2

### 2.1.4.3 Описание ферментационной установки №3

Экспериментально-производственная ферментационная установка состояла из ферментера, геометрическим объемом 1000 л (рис. 6). Подача пара для стерилизации осуществлялась от электрического парогенератора (ИПГ -110), Стерильный воздух подавался через фильтры тонкой очистки воздуха от воздушного компрессора. Эффективный объем ферментера составлял 600–700 л. Ферментер оснащен рубашкой для охлаждения и стерилизации среды. Контроль температуры выполняли термодатчиком в корпусе ферментера. Значение водородного показателя контролировали с помощью электрода рН. Регулировку значения рН осуществляли добавлением кислоты или основания, если показания выходили за пределы заданных программой значений. Кислоту и основание подавали с помощью перистальтических насосов. Концентрацию растворённого кислорода измеряли с использованием электрода рО<sub>2</sub>. Перемешивание осуществлялось с помощью механического перемешивающего устройства (мешалка с герметичным торцевым уплотнением, двухъярусная турбинная Раштон) для равномерного перемешивания среды по всему объему.

Уровень растворенного кислорода регулировали изменением объема воздуха и количества оборотов перемешивающего устройства. Стерилизацию пустого ферментера производили при температуре  $126^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  и давлении 0.15-0,16 МПа в течение одного часа. Питательную среду для ферментации стерилизовали непосредственно в ферментере. После стерилизации задавали расход воздуха в системе 100-150 литров в минуту, давление 0.05 МПа, и значение растворенного кислорода 100%. По достижении температуры  $25^{\circ}\text{C}$  из ферментера брали стерильную пробу для контроля по биохимическим и микробиологическим показателям.

Целесообразно использовать биореакторные установки объемом 1000 литров для производства опытно-промышленных партий продукции.

Использование биореакторных установок такого объема позволяет создавать условия для развития микроорганизмов, приближенные к производственным, что

упрощает последующее расширение производства на предприятиях, располагающих более вместительными биореакторами. Данные аппараты позволяют тестировать технологии выделения и очищения продуктов на уровне промышленного производства и выпускать партии, близкие по объемам к коммерческим.



Рисунок 6. Ферментационная установка №3

#### **2.1.4.4 Описание высокоскоростной центрифуги**

Экспериментально-производственная проточная центрифуга включает в себя корпус, головку, коллектор для жидкости, подшипники скольжения, привод и электродвигатель, а также другие компоненты (см. рисунок 7). Высокоскоростное вращение электродвигателя передает усилие на ленту и прижимные ролики через шкив головки на главный вал. Последний заставляет барабан вращаться, создавая внутри него мощное центробежное поле. Сырье подается в барабан снизу через

загрузочное отверстие и подвергается разделению под воздействием мощных центробежных сил.



Рисунок 7. Высокоскоростная центрифуга

Разделение жидкой и твердой фракций: легкая жидкость перемещается вверх по центру барабана и направляется в коллектор; тяжелая твердая фракция оседает на стенках барабана и вручную выгружается после остановки центрифуги. Параметры высокоскоростной центрифуги приведены в таблице 2.

Таблица 2- Параметры высокоскоростной центрифуги

Скорость	15000 об/мин
Поток	100 л/ч
Охлаждение	Вода, 15 С°

### 2.1.4.5 Описание лиофильной сушилки

Один из способов удаления влаги из материалов, которые не могут быть подвергнуты воздействию высоких температур из-за их чувствительности к теплу (термолабильности), - это лиофильная (или сублимационная) сушка (см. рис. 8). Сначала материал замораживают и охлаждают до температуры от -40 до -80 градусов Цельсия, затем помещают его в сублиматор. Далее обеспечивают подогрев материала для сушки до примерно 30 градусов Цельсия за счет подачи теплоносителя к поверхности, на которой находится высушиваемый материал. Сублиматор закрывают, снижают давление внутри него с помощью вакуумного насоса и включают компрессор холодильной установки. В результате взаимодействия замороженной субстанции и теплоносителя (около 30 градусов Цельсия) в условиях вакуума с остаточным давлением около 0,03 миллиметра ртутного столба (133 паскаля), вода переходит из твердого состояния сразу в парообразное. Пар поступает в десублиматор, где происходит процесс образования льда из пара на змеевике, а газ выводится с помощью вакуумного насоса. Режим сушки приведен в таблице 3.

Таблица 3- Режим лиофильной сушилки

Время заморозки	12 часов в морозильной камере при -25°C, либо 8 часов в камере сублиматора при -70°C.
Остаточное давление	от 4-6 Па
Температура сублиматора	не выше -35°C
Влажность	не более 8%



А

В

Рисунок 8. Лиофильная сушилка КС-30 (А), Alpha 2-4 LSCbasic (В)

## 2.2 Методы исследований

Схема проведения исследования представлена на рисунке 9.

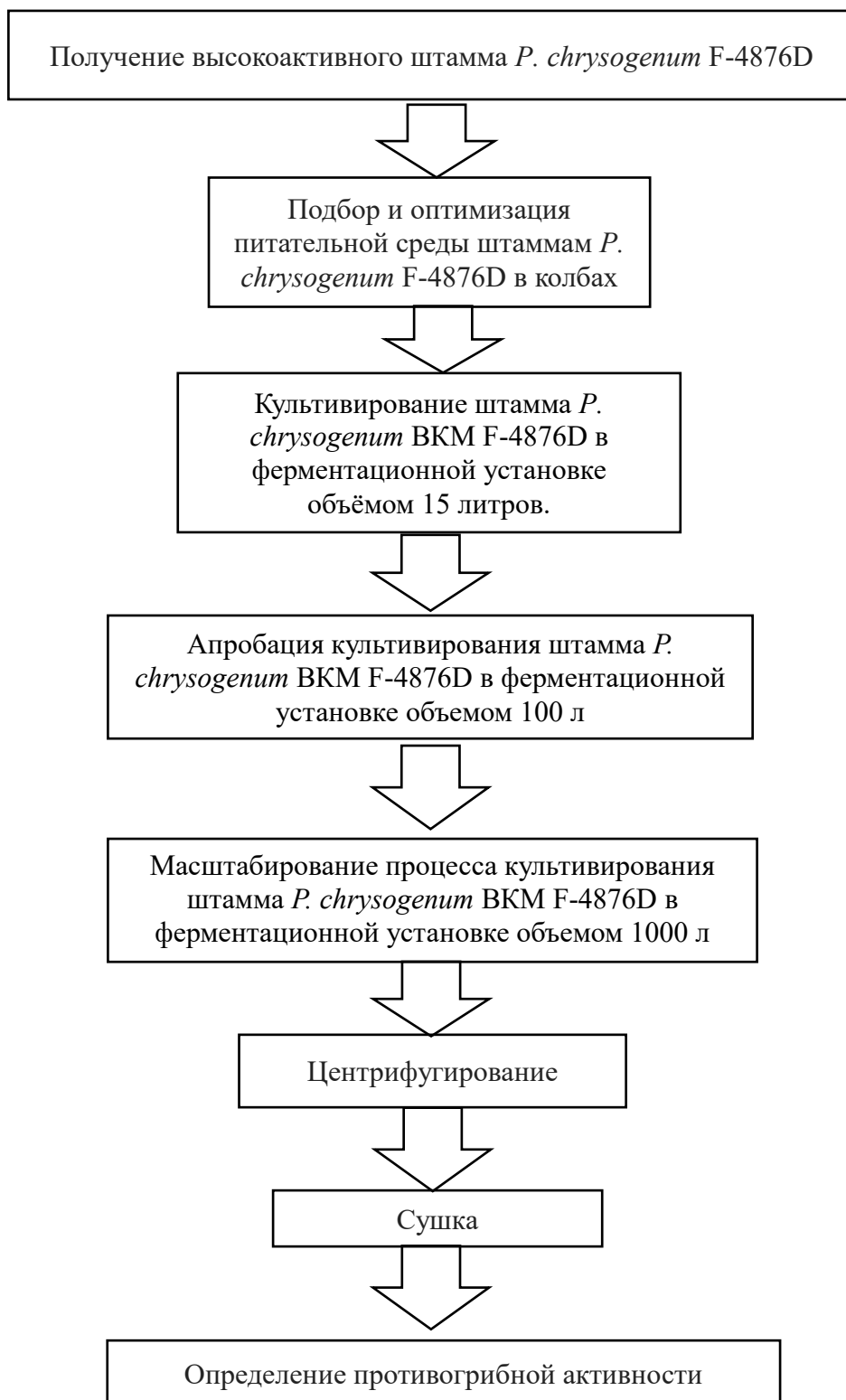


Рисунок 9. Схема проведения исследования



### **2.2.1 Получение штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D с помощью ненаправленного индуцированного мутагенеза**

В качестве мутагенного фактора были использованы УФ-лучи с длиной волны в диапазоне 250-280 нм (УФ-лампа ксеноновая, мощность 12,5 Вт).

Полученную путем смыва с агаровой среды суспензию, содержащую споры и обрывки мицелия, фильтровали через стерильный ватный фильтр или через воронку Шотта (размер пор 100 мкм). Концентрацию спор определяли с помощью камеры Горяева-Тома. Концентрация спор не должна превышать  $1 \times 10^7$  спор/мл, и при необходимости споровую суспензию разводили стерильной водой или физ.раствором. Затем, суспензию помещали в открытую чашку Петри и подвергали облучению. Расстояние от чашки до лампы составляло 40 см. Время экспозиции варьировало от 10 до 25 минут. После облучения, споровую суспензию (100-200 мкл) переносили на поверхность агаризованной среды и равномерно распределяли по поверхности. Затем, чашки Петри помещали в термостат с температурой 24°C и культивировали в течение 10-14 суток, отмечая время появления первых признаков роста. Из выросших на агаризованной среде колоний отбирали от 7 до 10 изолятов с измененными морфологическими признаками.

Выживаемости колоний определяли как соотношение числа колоний, выросших после облучения УФ, к количеству колоний, выросших в контрольных условиях. Эффективность мутагенеза рассчитывали по количеству появившихся после УФ-обработки колоний с измененными признаками. Отобранные колонии вновь рассеивали на агаризованную среду и затем культивировали в колбах с использованием питательной среды (ферментационную среду подготавливали в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.1.3.2 - приготовление питательных сред).

Для предварительной оценки продуктивности отобранных колоний использовали метод тонкослойной хроматографии. Колонии, обладающие максимальной продуктивностью, пересеивали и повторно подвергали УФ-

облучению. Для определения содержания мевастатина в культуральной жидкости использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## 2.2.2 Очистка и фракционирование белков

### 2.2.2.1 Приготовление осветленного лизата

Для выделения из биомассы *P. chrysogenum* белков и пептидов, обладающих противогрибной активностью, после окончания ферментации отбирали 50 мл культуральной жидкости и помещали в колбу. Для разрушения клеточной стенки клетки грибную биомассу обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут при комнатной температуре с использованием ультразвукового гомогенизатора (Bandelin Sonopuls).

Полученные лизаты клеток центрифугировали в течение 5 минут при 9000 g и 20°C для осаждения крупномолекулярных белков и других клеточных компонентов (рис. 10).



Рисунок 10. Осадок биомассы

Супернатант собирали и пропускали через фильтровальную бумагу на воронке Бюхнера, далее повторно очищали фильтрованием через воронку Шотта с

размером пор 100 мкм и повторно фильтровали через пористый стеклянный фильтр G2 (рис. 11).



Рисунок 11. Раствор после фильтрации

#### **2.2.2.2 Высаливание белков из раствора**

Для выделения низкомолекулярных белков в полученный супернатант при постоянном перемешивании добавляют кристаллический сульфат аммония, количество которого составляет 30% от объема раствора. Осаждение белков проводят в течение 12 ч при температуре 4°C. По истечении 12 часов на дне колб наблюдается взвесь белкового преципитата, которую передают на следующий этап очистки.

#### **2.2.2.3 Диализ**

Полученные после первого этапа очистки препараты белка диализовали против воды с использованием диализной мембраны 3500 MWCO (CelluSep, Канада) в течение двух суток с заменой буфера каждые 24 часа. После диализа очищенные белки замораживали при -54 °C и сушили на лиофильной сушилке Alpha 2-4 LSCbasic при давлении 0.109 мБар и температуре -80°C (рис. 8-В).

Эффективность очистки проверяли методом SDS-ПААГ электрофореза.

## 2.2.3 Анализ методом SDS-ПААГ электрофореза

### 2.2.3.1 Пробоподготовка образцов белка

После лиофилизации навеску белка растворяли в 500 мкл воды MilliQ и гомогенизировали в течение 5 минут с помощью вихревого миксера Multi-tube Vortex Mixer LMVM-A10. Далее смешивали водный раствор белка с загрузочным буфером с добавлением дитиотреитола (таблица 4) в первом варианте и с меркаптоэтанолом (таблица 5) во втором варианте в пропорции 1 : 3. Полученные образцы прогревали в эппендорфах в течение 5 минут при 95°C с помощью термостата (ТТ-2 «ТЕРМИТ», Россия).

Таблица 4 - Загрузочный буфер с ДТТ

Реагент	Конц.	Сток	8 мл
Вода MQ	-	-	4.32
Дитиотреитол	100 мМ	1 М	0.8
Tris*HCl, pH=6.8	50 мМ	1 М	0.4
Додecilсульфат натрия	2%	10%	1.6
Глицерин	10%	100%	0.8
Бромфеноловый синий	0.1%	~100x	0.08

Таблица 5 - Загрузочный буфер с меркаптоэтанолом

Реагент	Конц.	Сток	8 мл
Вода MQ	-	-	4.32
$\beta$ -меркаптоэтанол	-	14.5 М	0.8
Tris*HCl, pH=6.8	50 мМ	1 М	0.4
Додecilсульфат натрия	2%	10%	1.6
Глицерин	10%	100%	0.8
Бромфеноловый синий	0.1%	~100x	0.08

### 2.2.3.2 Электрофорез

Полимеризацию геля проводили в ячейке, образованной стеклами и прокладками, определяющими размер и толщину геля. Сборку ячейки проводили в соответствии с инструкцией по работе с камерой Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США) - прибором для вертикального электрофореза (рис. 12). Для данного прибора размеры стекол ячейки составляют 10.0x8.3 см; объем лунок 30 мкл. Состав гелей для электрофореза представлен в таблицах 6 и 7.

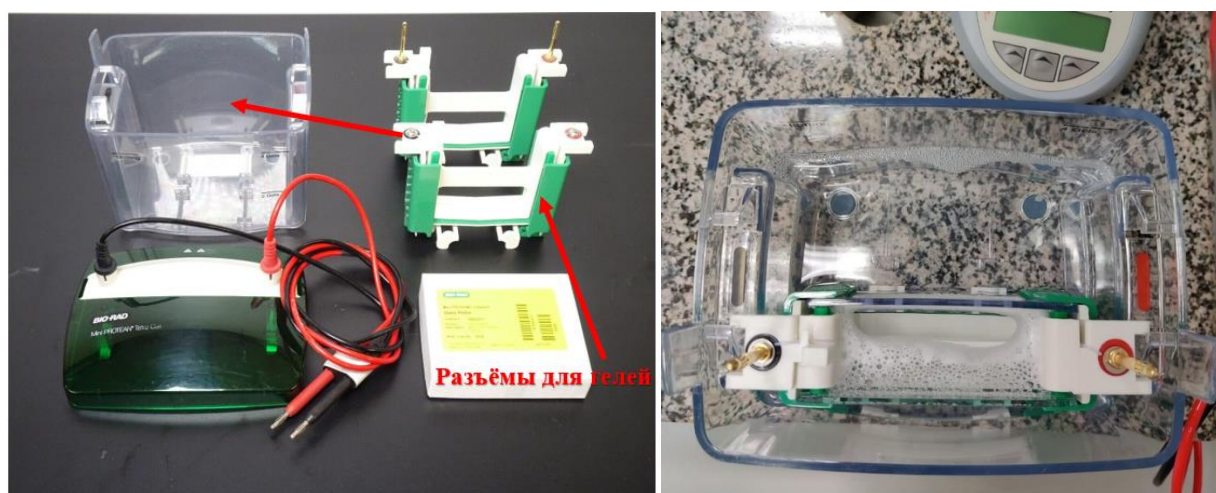


Рисунок 12. Камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra

Таблица 6 - Состав полиакриламидного концентрирующего геля для электрофоретического анализа – 5% акриламида

Реагент	Конц.	Сток	2 мл
Вода MQ	-	-	1.4
Акриламид	5%	30%	0.33
Tris*HCl, pH=6.8	0.13 M	1 M	0.25
Додecilсульфат натрия	0.1%	10%	0.02
Персульфат аммония	0.1%	10%	0.02
ТЕМЕД	1 мкл/мл	100%	0.002

Таблица 7 - Состав полиакриламидного разрешающего геля для электрофоретического анализа – 15% акриламида

Реагент	Конц.	Сток	10 мл
Вода MQ	-	-	1.05
Акриламид	15%	30%	5
Tris*HCl, pH=8.8	375 мМ	1 М	3.75
Додецилсульфат натрия	0.1%	10%	0.1
Персульфат аммония	0.1%	10%	0.1
ТЕМЕД	0.08%	100%	0.008

Нанесение образцов на гель проводили в следующем порядке. В лунки 1 и 5 вносили по 3 мкл смеси стандартных белков для электрофореза BlueRay Prestained Protein Marker (Jena Bioscience GmbH, Германия) и Precision Plus Protein Dual Xtra (Bio-Rad, США). В лунки 2 и 3 вносили по 10 мкл исследуемых образцов с буфером, содержащим дитиотреитол. В лунки 4 и 6 вносили также по 10 мкл исследуемых образцов с буфером, содержащим меркаптоэтанол. Электрофорез проводили в течение одного часа при напряжении 160 В и силе тока 40 мА.

### 2.2.3.3 Визуализация геля методом окрашивания серебром

По окончании процесса гель фиксировали в течение одного часа в 20% растворе трихлоруксусной кислоты (таблица 8). Далее гель перемещали в «Stop» раствор (таблица 9) и продолжали фиксирование в течение 40 минут при непрерывном перемешивании на качалочной установке Eppendorf Incubator Shaker series excella E25 (Великобритания) при 50 об/мин (эксцентриситет 2.5 см), температуре 35°C. После чего гель промывали в бидистиллированной воде по 20 минут 2 цикла.

Следующим этапом проявления результатов была сенситизация, для чего промытый гель помещали на 30 минут в 10% раствор глутарового альдегида (таблица 10) и снова промывали в бидистиллированной воде по 20 минут 3 цикла.

Далее гель помещали в окрашивающий раствор, содержащий аммиачную воду, 0.1 М гидроксид натрия, нитрат серебра и воду (таблица 11) и инкубировали в течение 30 минут на шейкере. Затем краску отмывали в бидистиллированной воде.

Заключительным этапом является проявление геля, для чего промытый гель помещали в ёмкость с раствором проявителя (таблица 12) и проводили визуализацию до первых заметных признаков проявления беловых пятен. После этого гель быстро переносили в «Stop» раствор на 5 минут для фиксации полученных результатов в объеме геля.

Таблица 8 – Приготовление 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты

Реагент	Конц.	Сток	100 мл
Трихлоруксусная кислота	20%	100%	20
Вода MQ	-	-	80

Таблица 9 - «Stop» раствор

Реагент	Конц.	Сток	100 мл
Этанол	40%	96%	41.6
Уксусная кислота	10%	100%	10
Вода MQ	-	-	48.4

Таблица 10 –Приготовление 10%-ного раствора глутаральдегида

Реагент	Конц.	Сток	40 мл
Глутаровый альдегид	10%	25%	16
Вода MQ	-	-	24

Таблица 11 - Состав гидроксида диамминсеребра (реактив Толленса)

Реагент	Конц.	Сток	40 мл
NaOH	19 mM	0,1 M	7.6
NH <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	0.49% (w/v)	35% (w/v)	0.56
AgNO <sub>3</sub>	0.8% (w/v)	20% (w/v)	1.6
Вода MQ	-	-	29.44

Таблица 12 - Раствор проявителя

Реагент	Конц.	Сток	100 мл
Лимонная кислота	0.005% (w/v)	1% (w/v)	0,5
Формальдегид	0.019% (w/v)	36% (w/v)	0.052
Вода MQ	-	-	99.45

#### 2.2.4 Изучение влияния белков *P. chrysogenum* на метаболическую активность фитопатогенных грибов

Анализ влияния белков *P. chrysogenum* на метаболическую активность фитопатогенных грибов *B. cinerea* и *F. oxysporum* проводили в плоскодонных 96-луночных планшетах («Greiner Bio-One», Австрия) с использованием картофельно-глюкозного бульона.

Для получения суспензии конидиоспор исследуемых фитопатогенов - *B. cinerea* (*F. oxysporum*), в пробирку с культурой возрастом 7 суток добавляли 10 мл жидкой картофельно-глюкозной среды и аккуратно стерильной микробиологической петлей снимали верхний слой воздушного мицелия с конидиями. Для удаления обрывков мицелия суспензию пропускали через стерильный ватный фильтр.

Фракции белков разводили стерильной водой до получения концентрации 5 мг/мл. Далее производили последовательно двухкратные разведения и диапазон концентраций составил 0,078-0,625 мг белковой фракции/мл среды. Вносили 100 мкл готовой конидиоспоровой суспензии в питательной среде (количество спор  $2,0 \times 10^5$ ).

Готовые экспериментальные планшеты выдерживали в термостате при температуре 25 °С, время роста составило 24 ч. Далее согласно методике (Park Y., 2008) в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора хлорида йодонитротетразолия с концентрацией 5 мг/мл с добавлением 4 мг/мл метоксифеназинметосульфата и выдерживали в условия термостата при температуре 37 °С в течение 4 ч.



Далее удаляли аккуратно жидкость без перемешивания осадка и приливали в каждую лунку по 50 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшегося формазана. Для этого культуральные планшеты оставляли при перемешивании 100 об/мин при температуре 37 °С в течение 16 ч.

Измерение оптической плотности проводили с помощью фотометра («ImmunoChem-2100», США) при длине волны 540 нм. Измерения проводили трижды.

Метаболическую грибную активность вычисляли по формуле:

$$\text{Метаболическая активность (МА)} = \frac{\overline{\text{ОП}}_{\text{оп}}}{\overline{\text{ОП}}_{\text{контр}}} \times 100\% \quad (1)$$

где  $\overline{\text{ОП}}_{\text{оп}}$  – среднеарифметическая величина показаний оптической плотности в опыте;

$\overline{\text{ОП}}_{\text{контр}}$  – среднеарифметическая величина показаний оптической плотности в контроле.

### **2.2.5 Определение содержания мевастатина в культуральной жидкости методом ВЭЖХ**

#### **Подготовка проб и экстракция.**

Для экстракции мевастатина к 1 части культуральной жидкости приливали 2 части этилацетата. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч со скоростью 290 об/мин и температуре 24°С ч. Затем, к 50 мкл этилацетатного экстракта добавляли 950 мкл метанола. Образцы центрифугировали на лабораторной центрифуге Eppendorf 5415R (Германия) в течение 3 мин при 12000 об/мин.

#### **Хроматографические условия.**

Для проведения ВЭЖХ анализа использовали жидкостной хроматограф 1200 Series (Agilent, США). Параметры ВЭЖХ указаны в таблице 13.

Таблица 13 - Параметры ВЭЖХ

Колонка	Luna 5 мкм C8(2) 100 Å
Скорость потока	1 мл/мин
Мобильная фаза	ацетонитрил/вода 65:35, об.
Давление	65 бар
Температура колонки	60°C
Детектор	УФ, 237нм
Объем пробы	100 мкл
Время хроматографирования	12 мин

#### Приготовление стандарта.

Для приготовления раствора стандарта мевастатина брали навеску коммерческого стандарта мевастатина (Sigma-Aldrich, 95 %) с концентрацией вещества 0,1 мг/мл. (рис. 13).

Формула для определения концентрации мевастатина в культуральной жидкости:

$$C = S (\text{обр.}) / S (\text{ст.}) \times C (\text{ст.}) \times R \quad (2)$$

Где:

C – концентрация мевастатина, [г/л];

S (обр.) – суммарная площадь пиков, образуемых кислотной и лактонной формами мевастатина;

S (ст.) – суммарная площадь пика, образуемого стандартом мевастатина;

C (ст.) – концентрация стандарта;

R – разведение анализируемого образца культуральной жидкости.

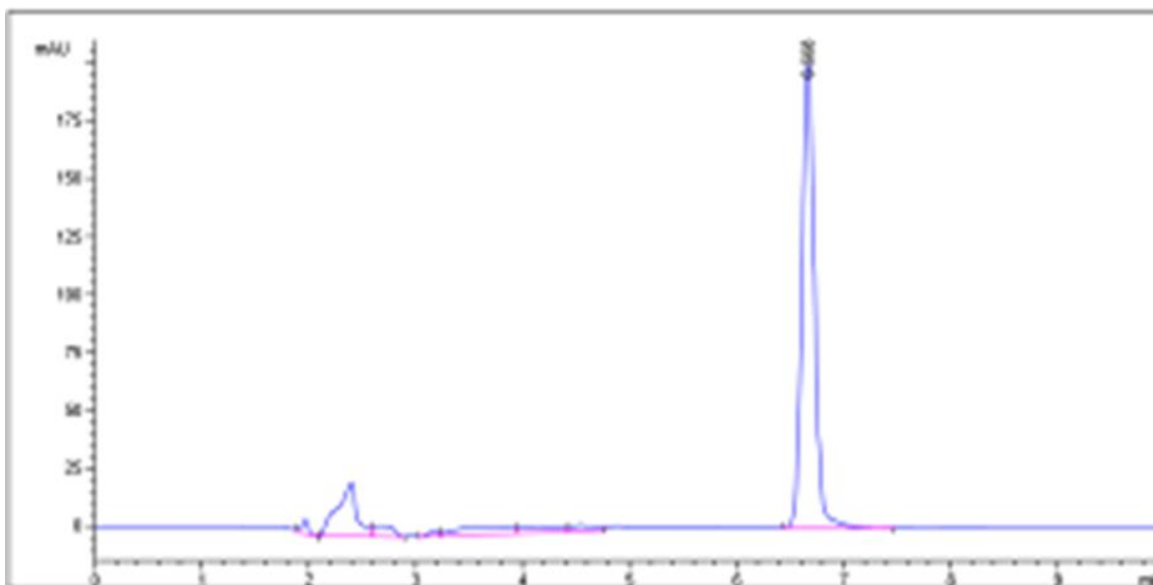


Рисунок 13. Хроматограмма стандарта мевастатина

### 2.2.6 Определение содержания биомассы в культуральной жидкости

Для определения количества биомассы (БМ) в культуральной жидкости аликвоты культуральной жидкости помещали в заранее взвешенные центрифужные пробирки и повторно взвешивали. Затем, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге Sigma 2-16P (Sigma, Германия). По окончании процесса, надосадочную жидкость декантировали и снова взвешивали пробирки с оставшейся биомассой.

Расчет биомассы производился по формуле:

$$X = \frac{b}{a} \times 100\%, \quad (3)$$

где **b** – масса осадка после центрифугирования исследуемого образца, **a** – масса исследуемого образца.

### 2.2.7 Исследование противогрибной активности методом радиального роста

Для получения агаризованной среды, содержащей БМ *P. chrysogenum*, стерильную водную суспензию БМ вносили в колбы со средой после стерилизации до получения конечной концентрации согласно условиям эксперимента. Фунгицид добавляли в колбы со средой КГА или средой КГА, содержащей БМ, после стерилизации в виде раствора в стерильной воде до получения концентрации (мг/л) 0,1 – 5,0 мг/л в зависимости от фунгицида. Полученные среды тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри.

Для оценки противогрибной активности использовали метод радиального роста (Karpova N., 2021).

Противогрибную активность вычисляли по формуле:

$$ПА = \left(1 - \frac{D_0}{D_k}\right) \times 100\% \quad (4)$$

где  $D_0$  - диаметр колонии в опытном варианте, мм;

$D_k$  - диаметр колонии в контрольном варианте, мм;

Контролем служили чашки Петри с патогеном, выращенным на среде КГА. Противогрибной эффект регистрировали на 3, 7 и 14 сутки.

Для определения синергетического эффекта использовали критерий Лимпела (Richer, D.L., 1987.), рассчитанный по формуле:

$$E_e = (X+Y)-XY/100 < E_r \quad (5)$$

где  $E_e$  – это суммарный (аддитивный) эффект от отдельного применения двух субстратов (%),  $X$  и  $Y$  – ингибирующая активность каждого компонента отдельно (%),  $E_r$  – ингибирующая активность, полученная при совместном применении биомассы и фунгицида, %.

$$(X+Y)-XY/100 < E_r$$

где  $E_e$  – это суммарный (аддитивный) эффект от отдельного применения двух субстратов (%),  $X$  и  $Y$  – ингибирующая активность каждого компонента отдельно (%),  $E_r$  – ингибирующая активности, полученная при совместном применении биомассы и фунгицида, % (Karpova N., 2021).

### 2.2.8 Статистическая обработка данных

Каждый эксперимент по оптимизации питательных сред для культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D проводился в 3 – 4 повторностях.

Статистическую обработку выполняли по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 7. Достоверность различий рассчитывали при доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

Каждый эксперимент по росту грибов в присутствии фунгицида, БМ или их комбинаций проводился три раза в трех повторностях, для расчета использовали среднеарифметическое значение. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы “STATISTICA 6.0” (StatSoft, Inc.). На диаграммах приведены значения среднего арифметического и стандартной ошибки. Уровень достоверности отличий между контролем и обработками ( $p < 0.05$ ) определяли, используя t-тест для независимых переменных.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Получение штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D, обладающего повышенной противогрибной активностью

Для увеличения противогрибной активности исходного штамма *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 была проведена серия работ с применением УФ мутагенеза и последующим отбором изолированных колоний, обладающих измененными морфологическими признаками.

#### 3.1.1 Построение кривой выживаемости *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310

Для определения оптимального времени воздействия мутагенного фактора на *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310, была исследована выживаемость клеток и частота появления клеток с измененными морфо-физиологическими признаками при УФ облучении. Результаты представлены на рисунке 14.

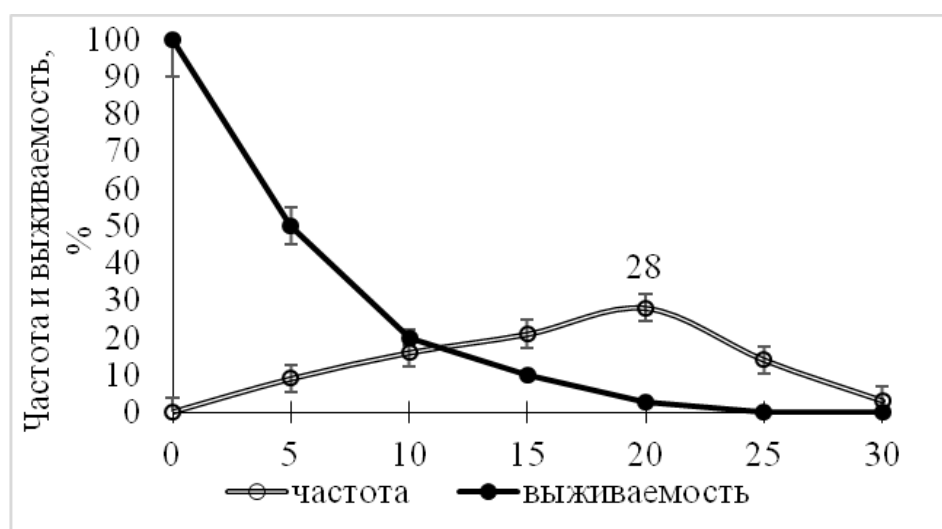


Рисунок 14. Выживаемость спор и обрывков мицелия гриба *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 в зависимости от продолжительности воздействия УФ – облучения

Согласно построенным кривым выживаемости и частоты появления колоний *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 с измененными морфологическими

признаками, оптимальное время воздействия составляет 20 мин. Именно при УФ облучении мицелиальной суспензии в течение указанного времени наблюдалось появление максимального количества колоний с измененной морфологией (28%). Выживаемость облученных клеток не превышала 2-2.5%.

### 3.1.2 Отбор изолятов и оценка противогрибной активности

После УФ-облучения клетки высевали на питательную среду в чашки Петри и культивировали в течение 10-14 дней. Затем отбирали 7-10 колоний, отличающихся от контрольных по цвету и форме. Отобранные моноколонии тестировали на антагонистическую активность по отношению к *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *A. solani*. Колонию с максимальной противогрибной активностью подвергали новому этапу мутагенеза и селекции. В результате серии последовательных мутагенезов *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 был получен новый штамм с войлочными колониями с неровным краем светлого серо-зеленого цвета. Полученному штамму был присвоен лабораторный индекс *P. chrysogenum* F-24-28. Для нового штамма была определена значительная противогрибная активность (рис. 15) по отношению к выбранным тест-культурам.

ПЦР анализ образца полученного штамма с использованием 18S РНК показал, что нуклеотидная последовательность на 100% совпадает с аналогичной последовательностью типовых штаммов *P. chrysogenum* CBS 306.48, *Talaromyces leycettanus* CBS 398.68, *Penicillium commune* CBS 343.51 на всем протяжении, поддающемся достоверной расшифровке, а вызванные мутации не затрагивают ген 18SPНК. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D.

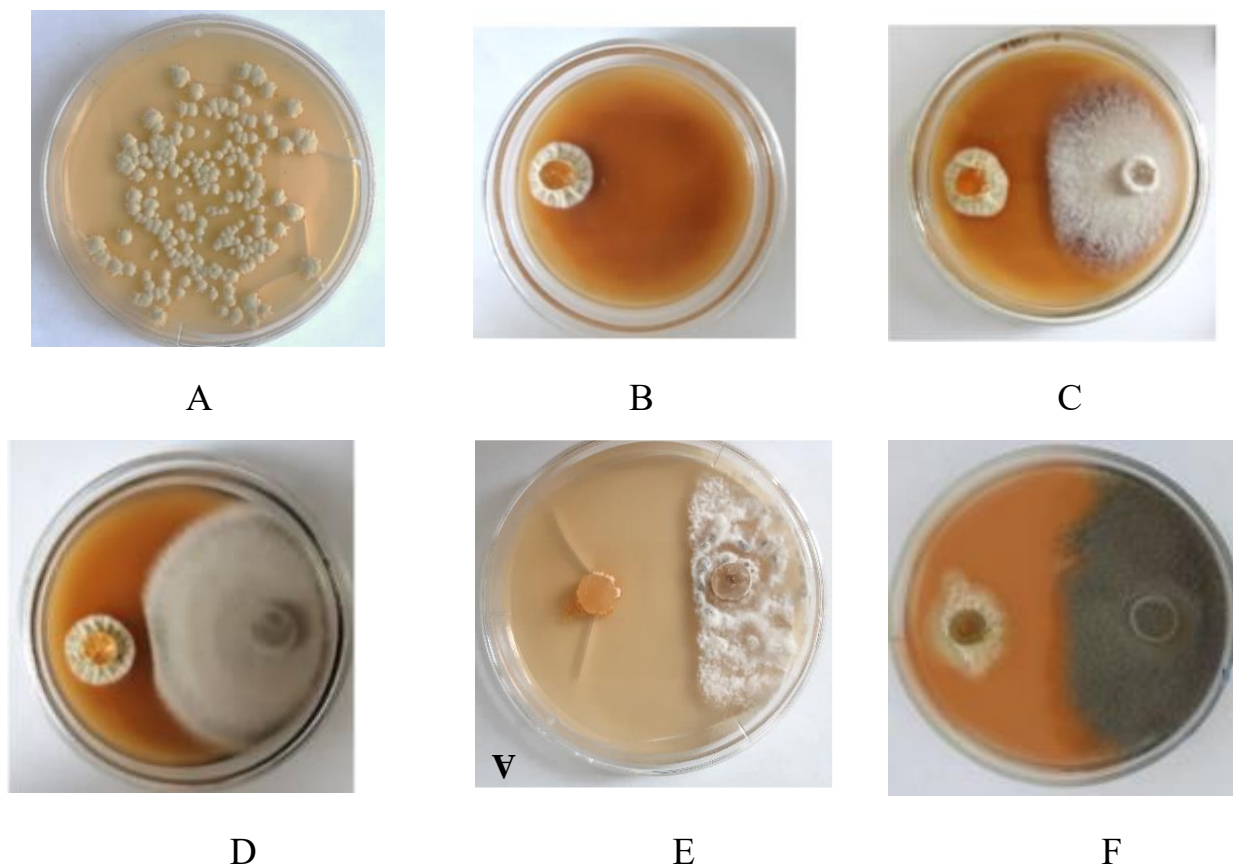


Рисунок 15. Штамм *P. chrysogenum* F-24-28 (A)

В,С,Д,Е - антагонистическая активности штамма *P. chrysogenum* F-24-28 (B) по отношению к *F. oxysporum* (C), *A. solani* (D), *S. sclerotiorum* (E), *B. cinerea* (F)

### 3.2 Определение вторичных метаболитов в биомассе *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

#### 3.2.1 Идентификация мевастатина

Обзор данных литературы показал, что ряд вторичных метаболитов грибов рода *Penicillium*, в частности, статинов, обладают высокой противогрибной и противовирусной активностью. Способность статинов эффективно ингибировать рост и развития фитопатогенных микроорганизмов известна. Поскольку способность к синтезу статинов также может быть свойственна в том числе и штаммам *P. chrysogenum*, представлялось интересным определить наличие веществ



данной группы соединений в биомассе *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D. С этой целью штамм выращивали в жидкой среде в 750 мл качалочных колбах Эрленмейера. Полученную биомассу инактивировали при 80 °С, отделяли от культуральной жидкости и сушили на лиофильной сушке.

Сравнительный качественный HPLC анализ экстракта сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D (БМРс) со стандартами подтвердил наличие мевастатина в анализируемом образце (рис. 16).

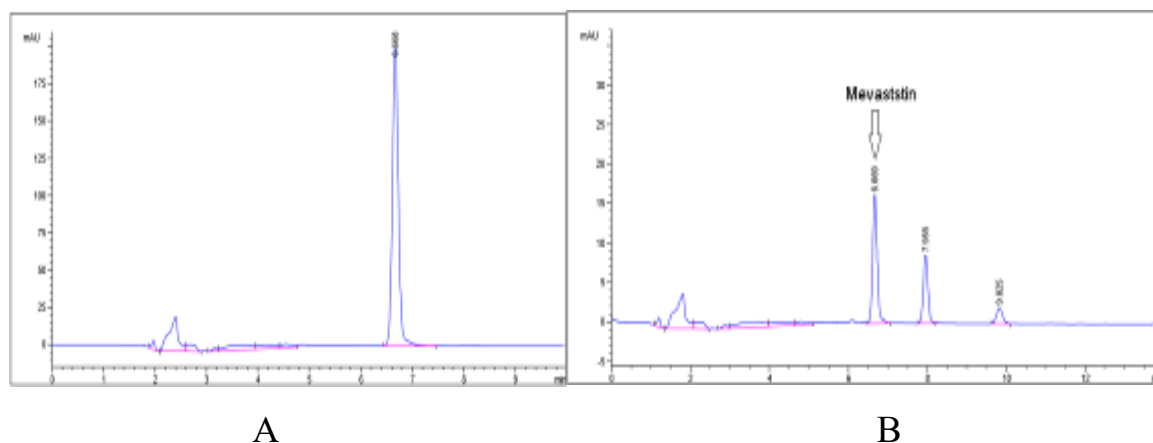


Рисунок 16. HPLC анализ: А-стандартный образец мевастатина, В – экстракт из БМРс

### 3.2.2 Результаты электрофореза белковых фракций, выделенных из биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Согласно ряду литературных данных, среди разнообразных метаболитов, синтезируемых грибами рода *Penicillium*, можно отдельно выделить вещества белковой природы. Так, например, известно, что выделенные из *P. chrysogenum* протеины PAF и PAFB, имеющие небольшие молекулярные массы от 5.8 до 10 кДа, проявляют высокую ингибирующую активность в отношении широкого спектра патогенных грибов и обладают противовирусным действием, не обладающим цитотоксическим воздействием на клетки млекопитающих в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Высокая стабильность PAF и PAFB при высоких температурах и в широком диапазоне pH делает их подходящими терапевтическими средствами для использования в медицине, защите растений и пищевых продуктов.

Известный белок PgChP, продуцируемый штаммом *P. chrysogenum* AS51D, показывающий противогрибную активность против токсигенных плесневых грибов, имеет высокую молекулярную массу 32-37 кДа. Определение его последовательности показало высокую идентичность данного белка с грибными хитозаназами.

Для выделения и очистки из биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D белков и пептидов использовали методы, модифицированные для данной исследовательской работы, описанные в п.2.2.2 и п. 2.2.3 Эффективность очистки проверяли методом SDS-ПААГ электрофореза п.2.2.4.

Результаты проведенного электрофореза образцов белковых фракций представлены на рисунке 17. Образцы 2 и 3 (экстракты белка) смешивали с загрузочным буфером с добавлением дитиотреитола. Образцы 4 и 6 (экстракты белка) смешивали с загрузочным буфером с добавлением меркаптоэтанола. На полученной электрофореграмме можно выделить 2 зоны с подвижностью компонентов: 10-12 кДа (зона I) и 35-37 кДа (зона II). При идентификации по всей электрофореграмме нами было выявлено большое сходство спектров белков. Все образцы имеют одинаковые симметричные типы спектров. В связи с этим можно заключить, что достоверных различий между образцами белков в двух буферах, содержащих дитиотреитол и меркаптоэтанол, обнаружено не было.

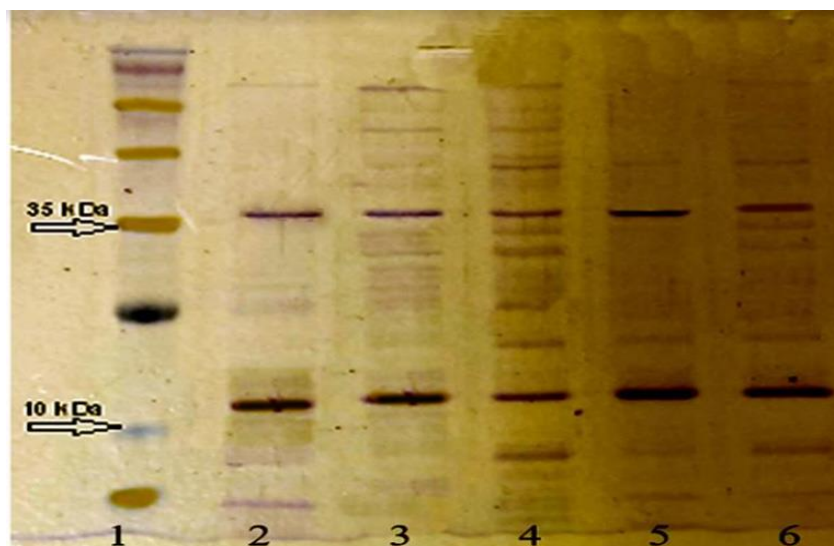


Рисунок 17. Электрофореграмма образцов очищенных белков из биомассы изолятов *P. chrysogenum*

Зона I характеризуется ярко окрашенными полосами в пределах 10-12 кДа, что, согласно литературным данным (Huber A., 2020), соответствует положению белков группы PAF, имеющих молекулярную массу 6,5-10 кДа. Для данной группы белков выявлена способность ингибировать рост и развитие следующих микроорганизмов: *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *A. solani*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *R. nigricans*, *Phoma exigua*, *Phoma betae*; *Cercospora beticola*, *Rizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana*.

Зона II оказалась менее интенсивно окрашена, но можно четко наблюдать и идентифицировать белковые полосы по соответствующим маркерным белкам 35 кДа. Из литературных источников нам известно, что штамм *P. chrysogenum* помимо низкомолекулярных пептидов синтезирует и гликолизированные белки молекулярной массой 35-37 кДа, обладающие хитиназной и хитозаназной активностью (обозначаемые как PgChP) (Rodríguez-Martín A., 2010).

В результате SDS-ПААГ электрофореза очищенных белков штамма гриба *P. chrysogenum* обнаружено, что каждый образец достоверно характеризуется определённым широким набором белков и пептидов. В данном эксперименте была проведена очистка, достаточная для обнаружения искомой группы пептидов в зоне I и II.

### 3.2.3 Изучение влияния белков, выделенных из биомассы *P. chrysogenum* F-4876D на метаболическую активность гриба *B. cinerea* и *F. oxysporum*

Для изучения активности выделенных белковых фракций на метаболическую активность патогенных грибов были выбраны следующие фитопатогены – *F. oxysporum* и *B. cinerea*. Результат представлен на рисунке 18.

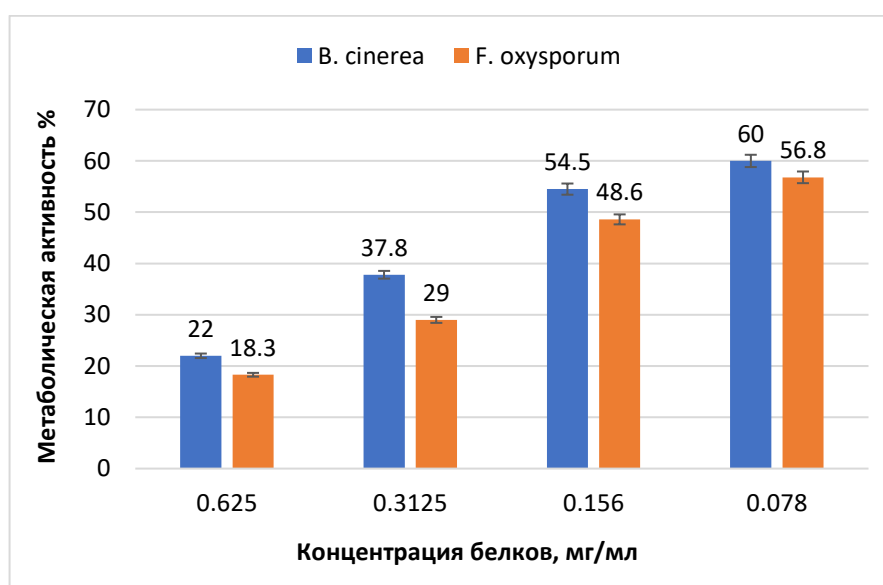


Рисунок 18. Динамика изменения метаболической активности *B. cinerea* и *F. oxysporum* при инкубации в присутствии белков *P. chrysogenum*

Как следует из полученных данных, растворы фракций белков при концентрации 0.625 мг/мл и 0.3125 мг/мл оказались наиболее эффективными по отношению к выбранным фитопатогенным грибным. Наблюдалось дозозависимое уменьшение метаболической активности в зависимости от концентрации белков. Степень прорастания спор (метаболическая активность) *B. cinerea* составила 22 и 37,8%, для *F. oxysporum* – 18,3 и 29% соответственно для 0,625 и 0,3125 мг/мл.

### 3.3 Оптимизация состава питательной среды

В биотехнологическом процессе, основанном на использовании высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, основная задача заключается не

только в создании этих продуцентов и обеспечении их жизнедеятельности, но и в определении оптимальных условий для их роста и развития.

Для успешного роста и развития микроорганизмов, используемых в биотехнологических процессах, необходимы следующие условия: наличие качественного посевного материала, достаточного количества питательных веществ и оптимальных физико-химических условий (Перт, 1978).

Для определения оптимальных условий культивирования и повышения продуктивности микроорганизмов был проведен ряд экспериментов по подбору компонентов питательной среды и регуляторов, которые могут максимально стимулировать синтез мевастатина. Результаты экспериментов оценивались по изменению производительности штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по мевастатину и биомассе.

### **3.3.1 Изучение влияния источника углерода на биосинтез мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D**

Углерод является одним из наиболее важных элементов в питании микроорганизмов, его содержание в сухой массе микроорганизма составляет около 50%.

Углеводы являются наиболее доступными источниками углерода для микроорганизмов, особенно моносахариды и гексозы. Они используются микроорганизмами для синтеза клеточных структур и служат источником энергии (Мосичев, 1982).

Исходная среда, используемая на начальном этапе исследования, в качестве источника углерода содержала сахарозу в количестве 200 г/л. Соответственно, в процессе реализации цели диссертационной работы представлялось интересным изучить изменение уровня биосинтеза мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D при замене сахарозы в базовой среде на такие компоненты, как мальтоза, глюкоза и меласса. Также был предложен вариант приготовления питательной среды для культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-

4876D на пищевом сахаре как наиболее дешевом и доступном сырье. Эксперименты проводились в конических колбах объемом 50 мл, содержащих 10 мл питательной среды, по 3 колбы на каждый вариант в трех повторностях. Культивирование штамма вели в течение 4 суток. Результаты представлены в таблице 14 и рис. 19.

Таблица 14 – Содержание сырой биомассы (%) и мевастатина (г/л) в культуральной жидкости на 4 сутки культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

<b>Источники углерода (концентрация 200г/л)</b>	<b>Содержание сырой биомассы, (%)</b>	<b>Содержание мевастатина, г/л</b>
Сахароза (контроль)	38,0±2,0	1,90±0,1
Сахар пищевой	38,0± 1,5	1,88±0,1
Мальтоза	25,0±1,5	1,12±0,1
Глюкоза	24,8±1,5	1,35±0,1
Меласса	35,2±2,0	1,62±0,1

Как следует из полученных данных, замена сахарозы на глюкозу и мальтозу привела, во-первых, к уменьшению на 34% количества сырой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в культуральной жидкости. Во-вторых, уровень биосинтеза мевастатина был снижен на 42,1% и 31,6% для вариантов с мальтозой и глюкозой соответственно. При замене сахарозы на мелассу сокращение содержания сырой биомассы не было столь значительным и не превышало 8-10%. Более заметным было снижение концентрации мевастатина в культуральной жидкости – на 15,8%.

Замена сахарозы на пищевой сахар не привела к каким-либо изменениям продуктивности *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по биомассе и мевастатину. В связи с чем, все остальные процессы по оптимизации состава питательной среды и разработке технологии получения сухой биомассы вели на пищевом сахаре.

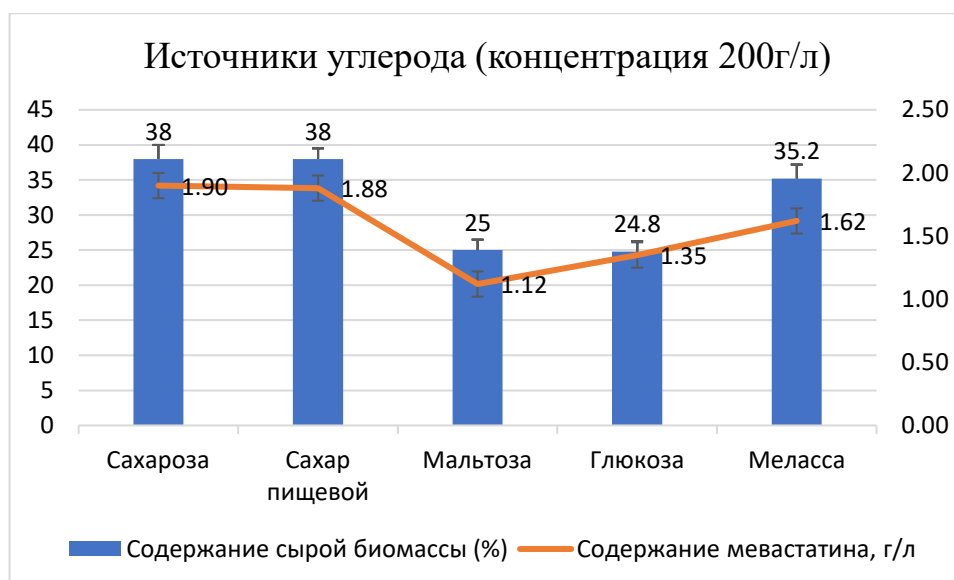


Рисунок 19. Влияние источников углерода на биосинтез мевастатина и накопление сырой биомассы

### 3.3.2 Влияние источников органического азота на биосинтез мевастатина и накопление биомассы в культуральной жидкости *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Мука растительного происхождения является не только ценным источником органического азота, но также и углеводов, жиров, органических кислот и разнообразных макро- и микроэлементов. Эти микроэлементы играют критически важную роль в биосинтезе различных соединений.

Таблица 15 – Содержание белка, крахмала по видам муки

Виды муки	Содержание белка %	Содержание крахмала %
Соевая мука	45	32
Гороховая мука	24	54
Овсяная мука	12	70
Кукурузная мука	12	80
Хлопковая мука	45-50	20-25

В качестве источника азота исходная среда, используемая в начале исследования, содержала соевую обезжиренную муку в количестве 30 г/л. В связи

с этим, представлялось интересным изучить влияние на биосинтеза мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D других видов муки, приведенных в таблице 15.

В ходе эксперимента оценивали такие показатели, как количество сырой биомассы (%) и мевастатина (г/л) в культуральной жидкости. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16- Влияние различных источников органического азота на рост и продуктивность штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Компоненты среды	Концентрация (г/л)	Содержание сырой биомассы (%)	Содержание мевастатина в КЖ (г/л)
Соевая мука (обезжиренная)*	30	39±2	1,9±0,1
Гороховая мука	30	30±2	1,0±0.1
Овсяная мука	30	33±2	1.2±0.1
Хлопковая мука	30	38±2	1,7±0,1
Кукурузная мука	30	25±2	0,5±0,1

\* - контрольные условия

Соевая полножирная и обезжиренная мука является ценным источником белка (около 45%) и крахмала (около 32%). По этой причине она также используется в качестве дополнительного источника крахмала. В ее золе (от 4,5 до 6,5%) содержатся К, Mg, Са и значительное количество Р (В.В. Бирюков, 1985).

Гороховая мука содержит не менее 24% белка, не менее 54% крахмала и очень небольшое количество жира (около 1,5%). Она также содержит различные микроэлементы, включая витамины и минералы.

Овсяная мука содержит около 12% белка, почти 70% крахмала и 6% жира. Она также богата минералами, включая фосфор, кальций и железо, а также медь.

Кукурузная мука содержит примерно 12% белка и до 80% крахмала. В ее составе также много фосфора, калия и магния (в золе, составляющей около 0,9%; Бирюков, 1985).



Хлопковая мука, которая используется в некоторых питательных средах, представляет собой богатый источник белка (примерно 45-50%). Однако она является дорогостоящим компонентом питательной среды и ее использование может быть экономически невыгодным.

На основе полученных в процессе культивирования данных, построен график, демонстрирующий влияние использованных компонентов питательной среды на биосинтез мевастатина и накопление сырой биомассы в целом.

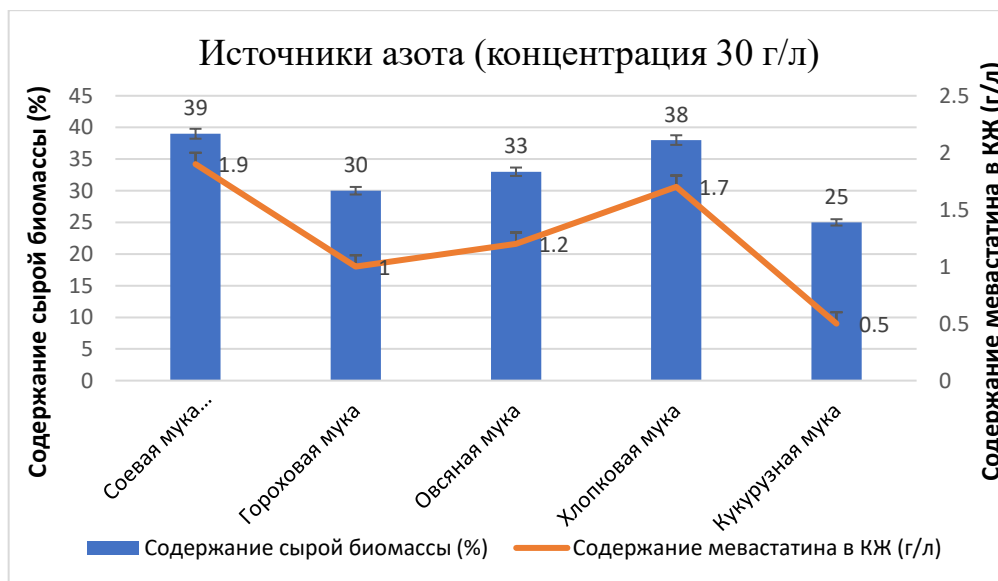


Рисунок 20. Влияние источников азота на биосинтез мевастатина и накопления сырой биомассы. Результаты представлены на 4 сутки культивирования

Из полученных данных следует, что максимальная концентрация мевастатина в культуральной жидкости (КЖ) наблюдается при культивировании штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в контрольных условиях на среде, содержащей обезжиренную соевую муку в концентрации 30 г/л. Продуктивность штамма составила  $1.9 \pm 0.1$  г/л мевастатина на 1 л культуральной жидкости и  $39 \pm 2\%$  сырой биомассы. Замена соевой муки на кукурузную привела к сокращению содержания сырой биомассы на 36% и в 3.8 раза был снижен уровень биосинтеза мевастатина. В варианте с гороховой мукой наблюдали практически 2-х кратное сокращение концентрации мевастатина в культуральной жидкости.

Стоит также подчеркнуть, что близкие результаты были получены при использовании хлопковой муки в роли источника азота, при условии, что

концентрация мевастатина в культуральной жидкости была меньше на 10%, чем при использовании соевой муки, и на 2,5% меньше содержание биомассы.

Однако, несмотря на полученные результаты, использование хлопковой муки в качестве источника азота считается экономически нецелесообразным, поскольку это дорогостоящий материал. В связи с этим, в последующих опытах мы предпочли использовать соевую муку в качестве источника азота.

### 3.3.3 Изучение влияния дополнительных источников азота на рост *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и биосинтез мевастатина

Для усиления биосинтеза мевастатина и накопления сырой биомассы штаммом *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в исходной питательной среде использовался гидролизат казеина (триптон). С целью определения оптимального состава питательной среды были протестированы другие компоненты – дрожжевой экстракт, мясной пептон, соевый пептон и сухое обезжиренное молоко (СОМ). Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Влияние различных источников дополнительного азота на рост и продуктивность штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D на 4 сутки культивирования

Компоненты среды	Концентрация (г/л)	Содержание сырой биомассы (%)	Содержание мевастатина в КЖ (г/л)
Гидролизат казеина (контроль)	10	40±2	1,95±0,1
Дрожжевой экстракт	10	30±2	0,8±0,1
Мясной пептон	10	38,5±2	1,75±0,1
Соевый пептон	10	32±2	1,6±0,1
СОМ	10	37±2	1,89±0,1

На основе полученных данных построены графики, отражающие влияние использованных компонентов дополнительного азотного питания на биосинтез мевастатина и увеличение биомассы.

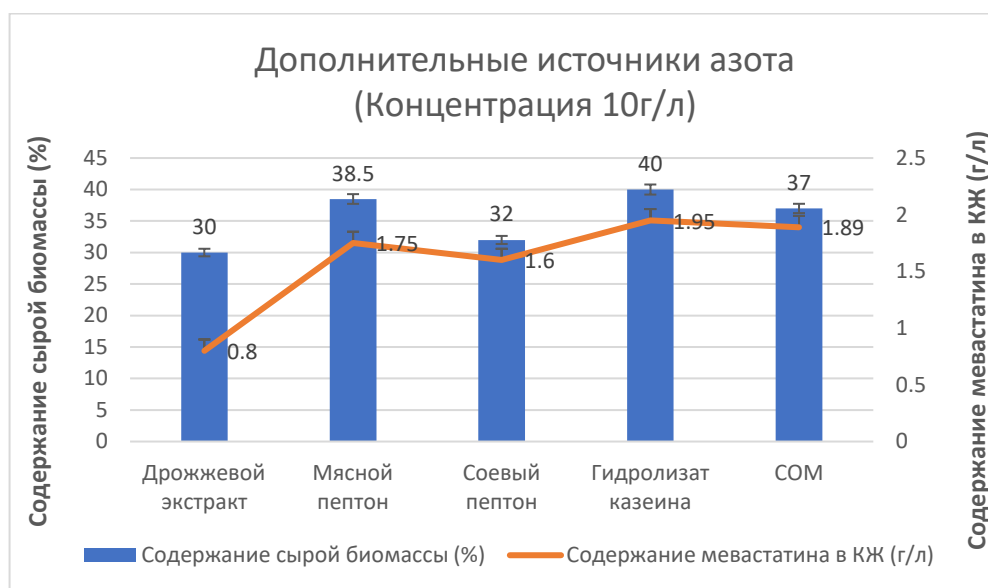


Рисунок 21. Влияние дополнительных источников азота на биосинтез мевастатина и накопления сырой биомассы на 4 сутки культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что максимальная концентрация мевастатина в культуральной жидкости наблюдается при культивировании штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D на контрольной среде, содержащей гидролизат казеина в концентрации 10 г/л. На этом этапе продуктивность штамма составила  $1,95 \pm 0,1$  г/л мевастатина на 1 литр культуральной жидкости и  $40 \pm 2$  % сырой биомассы. Замена гидролизата казеина на более доступное сухое обезжиренное молоко привело к практически одинаковому накоплению мевастатина в культуральной жидкости за аналогичный период культивирования штамма при относительно одинаковом уровне накопления биомассы.

Основываясь на предыдущих результатах и учитывая, что оба источника способствуют достижению одного и того же результата, мы выбрали обезжиренное

молоко в качестве дополнительного источника азота, поскольку оно считается дешевым материалом по сравнению с гидролизатом казеина.

### 3.3.4 Изучение влияния минеральных солей на накопление мевастатина и биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Такие микроэлементы, такие как S, Ca, P, Mg и K являются обязательными элементами для нормального функционирования микробных клеток, обеспечивая нормальное функционирование ферментных систем. Кроме того, микроэлементы регулируют проницаемость клеточных мембран, участвуют в переносе энергии и активируют работу различных ферментов.

Контрольная (или исходная) питательная среда содержала  $\text{NaNO}_3$  (2.0 г/л) и  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (1 г/л). В процессе оптимизации состава среды была проведена работа, цель которой заключалась в определении изменения уровня биосинтеза мевастатина и накопления биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в культуральной жидкости при замене  $\text{NaNO}_3$  на  $\text{KNO}_3$  или  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Также было проведено исследование по изучению влияния на продуктивность *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и биосинтез мевастатина присутствия  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  и дополнительного внесения в контрольную среду карбоната кальция. Состав сред представлен в таблице 18.

Таблица 18- Варианты состава сред для культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Вариант среды	Состав, г/л
Среда 1 (контроль)	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, <b><math>\text{NaNO}_3</math></b> 2.0 г/л и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0.
Среда 2	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, <b><math>\text{KNO}_3</math></b> 2.0 г/л и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0.
Среда 3	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, <b><math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math></b> 2.0 г/л и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0.
Среда 4	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, $\text{NaNO}_3$ 2.0 г/л и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, <b><math>\text{CaCO}_3</math> – 1.0</b>

Таблица 19- Влияние дополнительных источников макроэлементов на рост *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и процесс биосинтеза мевастатина

Состав среды	Содержание сырой биомассы (%)	Содержание мевастатина в КЖ (г/л)
Среда 1	38±2	1,9±0.1
Среда 2	35±2	1,6±0,1
Среда 3	30±2	1.0±0.1
Среда 4	28±2	0,9±0,1

Как следует из полученных данных (в таблице 19 и рисунке 22), максимальная продуктивность *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по мевастатину наблюдалась в контрольном варианте, содержащем нитрат натрия и сульфат магния, что подчеркивает необходимость присутствия данных макроэлементов для нормального роста и развития штамма и биосинтеза мевастатина. Добавление же в среду карбоната кальция ингибировало процесс накопления в культуральной жидкости мевастатина и накопления биомассы.

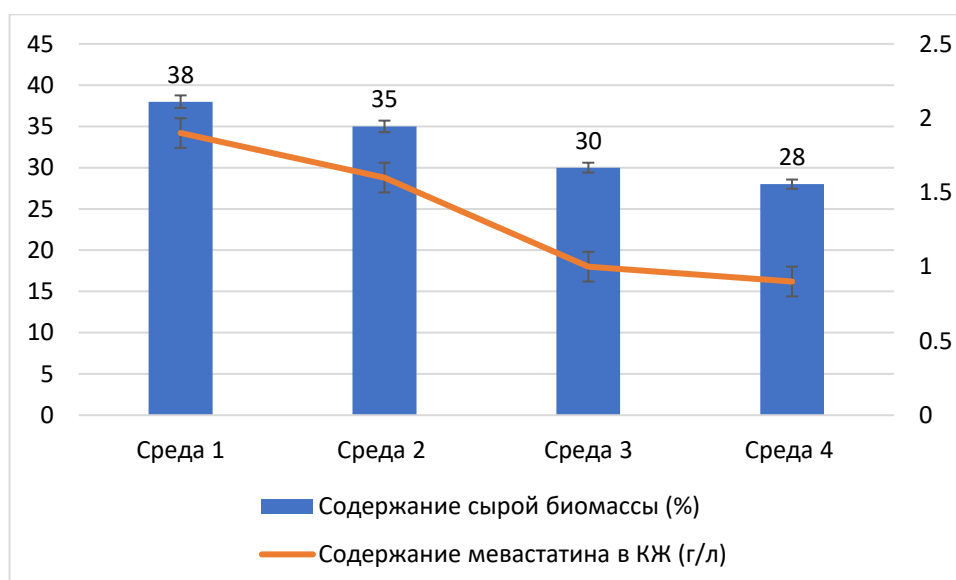


Рисунок 22. Влияние дополнительных источников макроэлементов на рост *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и процесс биосинтеза мевастатина

### 3.4 Оптимизация количества сахара в питательной среде для культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Для оптимизации и удешевления процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D была проведена серия работ по изучению влияния на накопление биомассы и биосинтез мевастатина уменьшения концентрации вносимого в питательную среду сахара.

Поскольку помимо мевастатина, *P. chrysogenum* способен синтезировать другие метаболиты, определяющие его противогрибное действие, то представлялось интересным также провести оценку противогрибной активности методом радиального роста получаемой сухой биомассы (1 г/л). Тест -культурой был выбран *F. oxysporum*. Результаты подавления роста *F. oxysporum* оценивали на 7 сутки эксперимента.

Состав новой ферментационной среды для культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D (г/л): сахар - 200, соевая мука – 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> - 2, MgSO<sub>4</sub> - 1.

Для изучения влияния количества вносимого сахара на рост и биосинтез мевастатина использовали базовую среду, различающуюся содержанием сахара в 4-х вариантах:

- сахар - 200, соевая мука - 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> – 1.
- сахар - 100, соевая мука - 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> – 1.
- сахар - 75, соевая мука - 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> – 1.
- сахар - 50, соевая мука - 30, СОМ - 10, NaNO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> – 1

Выращивание *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D вели в условиях, описанных в материалах и методах, глава 2.1.3.2. Результаты представлены в таблице 20.

Из представленных данных в таблице 19 следует, что при уменьшении в 4 раза содержания сахара в питательной среде происходит снижение концентрации мевастатина в культуральной жидкости на 31,25%.

Таблица 20 - Целевые показатели штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в различных вариантах ферментативной среды

Вариант	Количество сахара, г/л	рН	Содержание сырой биомассы, %	Концентрация мевастатина г/л	Противогрибная активность, %
1	200	5,10	32,46 ±2	1,6 ±0.1	56,2
2	100	5,27	31,16 ±2	1,5 ±0.1	52,4
3	75	5,90	27,95 ±2	1,3 ±0.1	50,7
4	50	5,98	26,7 ±2	1,1 ±0.1	48,5

С уменьшением концентрации мевастатина наблюдается понижение противогрибной активности полученной биомассы на 26,7%. Для дальнейшей экспериментальной работы количество вносимого сахара составило 100 г/л, поскольку двухкратное сокращение данного компонента среды не оказало существенного влияния на содержание мевастатина в культуральной жидкости и фунгицидную активность сухой биомассы против возбудителя фузариоза. Таким образом, подобран состав оптимизированной ферментационной среды (г/л): сахар - 100, соевая мука - 30, сухое обезжиренное молоко - 10, NaNO<sub>3</sub> - 2, MgSO<sub>4</sub> - 1.

### 3.5 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объёмом 15 литров

#### 3.5.1 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D при нерегулируемом режиме ферментации в ферментере объёмом 15 литров.

Культивирование штамма проводили в 3 повторностях на оптимизированной питательной среде, описанной в п. 3.4. Основные показатели процесса: накопление сырой биомассы, изменение активной кислотности среды, изменение концентрации растворенного кислорода и содержания мевастатина.

#### Приготовление посевного материала первой генерации в колбах.

### **Выращивание посевного материала 1 генерации.**

Исходную культуру *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D поддерживали на агаровой среде при 4 – 6 °С. Перед засевом в ферментационную установку культуру рассевали на свежую агаровую среду с последующей инкубацией при 24 °С в течение десяти суток .

После проверки на стерильность и биосинтетическую активность, полученную партию пробирок со скошенным агаром использовали для приготовления посевного материала.

Выращивание посевного материала для ферментера осуществляли в две генерации в колбах емкостью 100 и 500 мл.

Маточную колбу объемом 100 мл, содержащую 20 мл вегетативной среды, засевали взвесью спор (концентрация  $10^6$  КОЕ/мл) или кусочком (1 x 1 см) агаризованной культуры. Маточные колбы помещали на качалку (эксцентриситет 5 см) и наращивали посевной материал в течение 48 часов при температуре 24°С. По истечении указанного срока культура продуцента должна иметь вид равномерной густой взвеси светло-серого цвета с грибным запахом.

### **Выращивание посевного материала 2 генерации.**

10 рабочих колб объемом по 500 мл содержащие по 100 мл вегетативной питательной среды засевали 10-20 мл культурной жидкости из маточных колб. Выращивание проводили на качалке (эксцентриситет 5 см) в течение 48 часов при 24 °С.

Готовый посевной материал должен иметь вид равномерной густой взвеси светло-серого цвета с грибным запахом.

Рабочие колбы с соблюдением правил асептики объединяли в одну. Из общего содержимого колбы отбирали пробу, из которой делали препарат для микроскопирования и рассев на чашки Петри с питательным агаром с последующей инкубацией при 37 °С в течение 24 – 48 часов для проверки на отсутствие посторонней микрофлоры. Культура должна быть однородной и представлять собой в основном ветвящиеся гифы и отдельные колонии.



В случае необходимости посевной материал можно хранить при 4 – 6 °С в течение 3 – 4 дней без изменения его качества.

### Культивирование штамма *P. chrysogenum* в 15 л ферментере.

Технологический процесс культивирования штамма *P. chrysogenum* проводят в ферментере емкостью 15 л.

Таблица 21- Режим в ферментере перед посевом

Наименование параметра	Значение показателя
Объем питательной среды	10 л
Температура культивирования	(24 ± 1)°С
Расход воздуха	0.1 л/л/мин
Обороты мешалки	250 об/мин
Растворенный кислород	100%
Давление в ферментере	0.03-0.05 Мпа
Водородный показатель	6.8-7.0

В процессе выращивания культуры наблюдалось повышение рН среды с 6,1 до 7,6. Содержание сырой биомассы на 65 ч ферментации достигло 30%, затем ее количество сокращалось. Количество мевастатина в КЖ к концу периода культивирования достигло 1,3±0,10 г/л (рисунок 23).

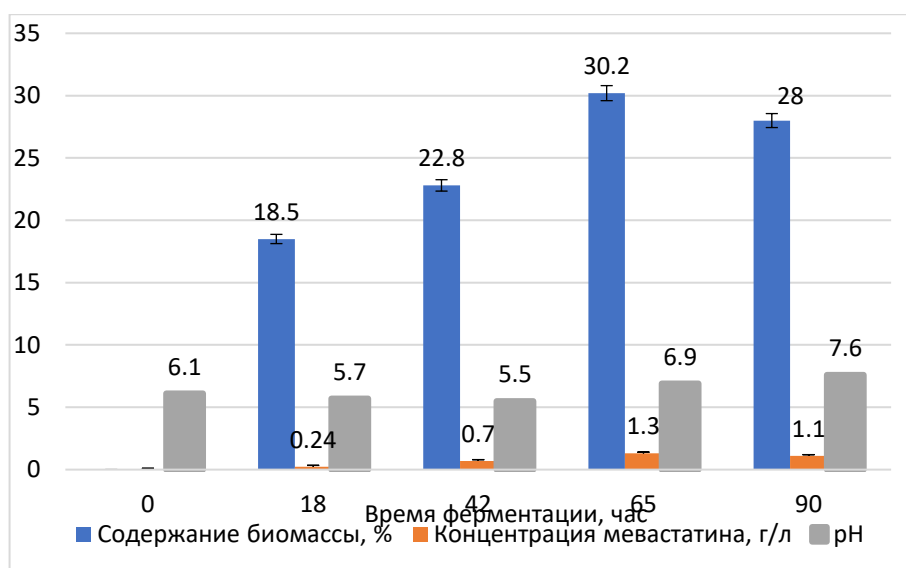


Рисунок 23. Культивирование штамма *P. chrysogenum* VKM F-4876D в нерегулируемом режиме ферментации

### 3.5.2 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной среде в режиме регулирования водородного показателя

Как известно, следствием отрицательного влияния повышенного или пониженного значения уровня водородного показателя культуральной жидкости является или замедление скорости накопления биомассы, или лизис культуры. Для подтверждения данного предположения и определения оптимального значения рН, проведена серия ферментаций при различных значениях водородного показателя среды. Культивирование проводили в 15-литровом ферментере, состав среды описан в п.3.4. Посевной материал готовили согласно условиям пункта 3.5.1. Водородный показатель среды поддерживали путем подачи 10% р-ра HCl при помощи перистальтического насоса в автоматическом режиме.

Контрольной являлась ферментация, проводимая в режиме регистрации основных технологических и биохимических параметров без регуляции водородного показателя. Результаты представлены на рисунке 24. Как следует из полученных данных, лучшие результаты были достигнуты при уровне водородного показателя культуральной жидкости 6,9. В связи с чем, в последующих экспериментах водородный показатель в процессе ферментации в культуральной жидкости поддерживали на уровне 6,8-7,0.

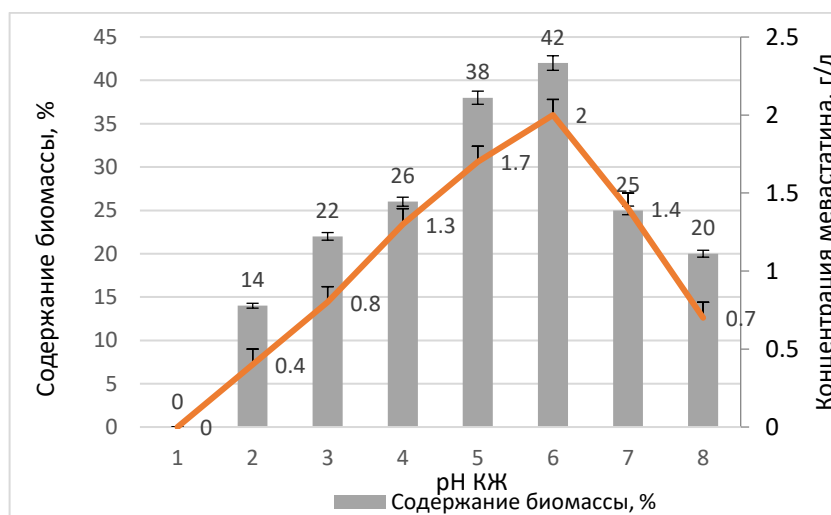


Рисунок 24. Накопление биомассы и мевастатина в культуральной жидкости штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D при различных уровнях водородного показателя к 92 ч ферментации

### 3.5.3 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D на ферментационной среде в условиях регулирования водородного показателя в культуральной жидкости контроля и концентрации растворенного кислорода

В процессе выращивания микроорганизмов в биореакторах, важным параметром, оказывающим влияние на биосинтез целевого вещества, является концентрация растворенного кислорода (Shioya S., 1999). В связи с чем, проведена серия экспериментов по оценке влияния заданных концентрации растворенного кислорода на накопление биомассы и продуктивность штамма при условии автоматического контроля уровня кислотности 6,8-7,0. Культивирование вели в биореакторе объемом 15 л, состав среды представлен в п.3.4. Процедура подготовки посевного материала описана в разделе 3.5.1.  $pO_2$  в ростовой среде изменяли путем регуляции числа оборотов перемешивающего устройства. В результате было установлено (см. рис. 25), что максимальная продуктивность по мевастатину и наибольший прирост биомассы отмечены при значении  $pO_2$  в пределах 30% - 50% и составили  $2 \pm 0,1$  г/л и 40% ( $\pm 2\%$ ) соответственно.

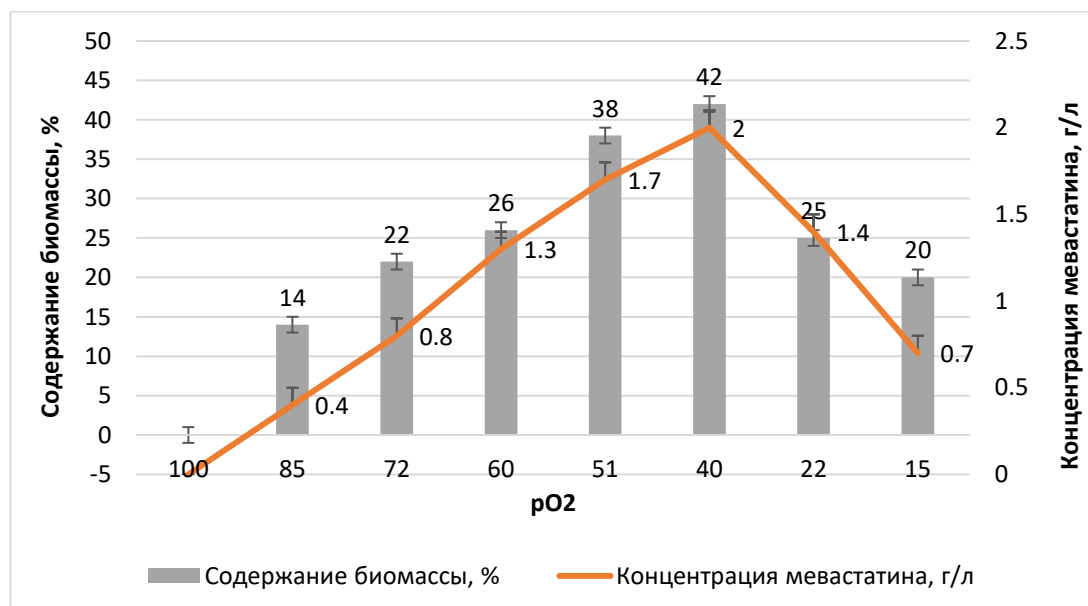


Рисунок 25. Влияние  $pO_2$  в культуральной жидкости на процесс накопления биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и выход мевастатина на 92 ч ферментации ( $pH = 6.8 - 7.2$ )

### **3.6 Апробация культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 100 л в режиме контроля параметров pH и pO<sub>2</sub>**

Приготовление посевного материала описано в разделе 3.5.

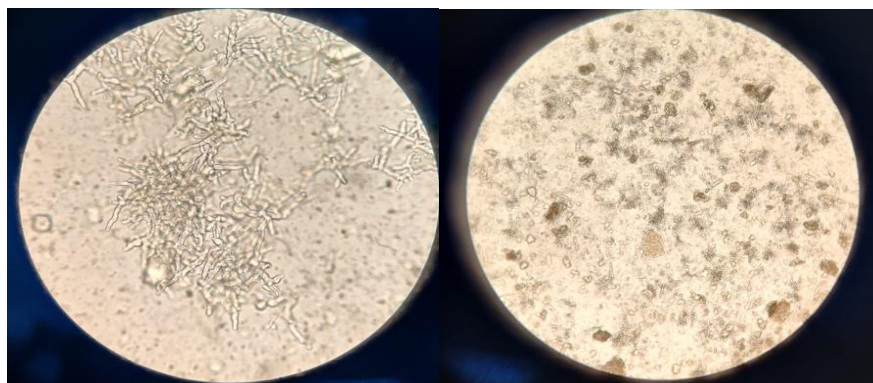
Посевной материал, объем которого составлял 10% от объема среды, заседали в 15-литровый ферментер.

Выращивание посевного материала в ферментере объемом 15 л проводили при следующих условиях:

- Температура - 24°C
- Исходная скорость вращения мешалки 250 об/мин
- для поддержания уровня pO<sub>2</sub> в процессе ферментации увеличивали скорость перемешивания до 500 – 600 об/мин; концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 30% от насыщения до окончания процесса.
- регистрация водородного показателя
- При интенсивном пенообразовании изменяли скорость перемешивания или вносили пеногаситель.

Для контроля стерильности ферментационного процесса, оценки стадии роста мицелия, количества сырой биомассы и определения содержания редуцирующих сахаров, через 18-24 часа от начала процесса отбирали пробу культуральной жидкости.

Продолжительность процесса выращивания посевного материала определяли по анализу сырого веса мицелия и путем микроскопического контроля.



а)

б)

Рисунок 26. Посевной материал под микроскопом:

а) увеличение 40X; б) увеличение 10X

Посевной материал должен удовлетворять следующим требованиям:

1. Внешний вид культуры. Равномерная взвесь мицелия сероватого цвета, занимающая не менее 80% объема пробыв пробирке.
2. Микроскопическая характеристика. Отдельные и соединенные колонии.
3. Чистота культуры. Посторонняя микрофлора отсутствует.

Полученный посевной материал использовали для засева рабочего ферментера объемом 100 л.

#### **Приготовление ферментационной среды.**

Выращивание штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D проводили в 100-литровом ферментере с коэффициентом загрузки не более 0,7.

Ферментационную среду готовили непосредственно в ферментере. Предварительно ферментер был простерилизован с воздушными фильтрами острым паром при температуре  $124 \pm 1$  °С и давлении 0.1 - 0.15 МПа в течение одного часа давлении 1,0-1,5 в течение 1 часа. Предварительно готовили питательную среду состава (г/л): сахар - 100, соевая мука – 30, сухое обезжиренное молоко - 10, NaNO<sub>3</sub> - 2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - 1. pH – 6,8–7,0.

Все взвешенные компоненты кроме сахара через люк поочередно подавали в ферментёр. Доводили объем очищенной водой до 63 л. Значение водородного показателя довели до 6,8. Среду нагревали до 90-100°С подачей пара в рубашку ферментера. Затем температуру повышали до  $125 \pm 1$  °С подачей острого пара

внутри аппарата через барботер, пробоотборник и нижний слив. Время стерилизации 60 мин. По завершении стерилизации питательную среду охлаждали до температуры  $24 \pm 1$  °С.

Таблица 22 - Режим в ферментере перед посевом

Наименование параметра	Значение показателя
Объем ферментационной среды	70 л
Температура	$(24 \pm 1)$ °С
Расход воздуха	35 л/мин
Скорость перемешивания среды	100 об/мин
Значение $pO_2$	100% от насыщения
Давление	0.03-0.05 Мпа
Водородный показатель среды	6.8-7.0

Из ферментера до посева отбирали пробу среды для контроля по микробиологическим и биохимическим показателям. Посев ферментера со стерильной ферментационной средой, производили посевным материалом, полученным согласно п. 1.13.2. Посевная доза-10% от объема среды в 100 л ферментере (1 л). Посевной материал поступал в ферментер по стерильной посевной линии.

Выращивание штамма-продуцента в ферментере проводили в условиях, представленных в таблице 23.

Параметры культуральной жидкости в конце процесса:

- отсутствие посторонней микрофлоры;
- микробиологическая характеристика: культура полиморфна, в основном состоит из уплотненных колоний с выраженной базофилией и отрывков слабо базофильных гиф.

Таблица 23 - Основные параметры культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в 100 л ферментере

Наименование параметра	Значение показателей
Температура	24°C
Расход воздуха	35-70 л/мин
Водородный показатель среды	Накопление биомассы сопровождается самопроизвольным снижением рН до 5,0 – 5.2 и дальнейшим подъемом на стадии биосинтеза до 6.5 – 7.5. При необходимости проводят корректирование рН 20% NaOH или 10% HCl
Обороты перемешивающего устройства	Обороты перемешивающего устройства в течение процесса увеличивают до 100 – 450 об/мин для поддержания необходимого уровня растворенного кислорода; концентрация растворенного кислорода поддерживается на уровне 50% от насыщения до окончания процесса.
Время культивирования	72-96 часов
Контроль процесса культивирования	Через сутки после посева отбирают пробу для микробиологического и биохимического контроля процесса. Далее отбор проб проводят не реже 1 раза в сутки.

### 3.7 Масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л

Как известно, в процессе разработки технологии микробиологического синтеза биологически активного вещества, вначале определяются основные параметры, необходимые для проведения процесса в лабораторных условиях,

которые затем постепенно масштабируются до производственного уровня. Приоритетной задачей процесса масштабирования биотехнологического производства является увеличение объемов производимого целевого вещества. При этом, обязательным условием является поддержание или увеличение продуктивности используемого штамма-продуцента и сохранение необходимого качества целевого продукта (Schmidt F.R., 2005).

Масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D проводили в ферментере объемом 1000 л на оптимизированной ферментационной среде (п. 3.4.). Параметры ферментации (уровень pH и  $pO_2$ ) были определены на предыдущих этапах исследования. Динамика накопления биомассы и содержание мевастатина в культуральной жидкости в процессе ферментации *P. chrysogenum* представлены на рисунке 27.

Для приготовления посевного материала использовали колбы и ферментеры объемом 15 л и 100 л. Посевная доза составляла 10% от рабочего объема ферментационной среды (аналогично п. 3.6). Процесс культивирования в колбах, ферментерах объемом 15 и 100 л описан в разделе 3.6.

Полученный посевной материал из ферментера объемом 100 л передавали в ферментер объемом 1000 л через стерильную посевную линию.

Режим в ферментере перед посевом:

- температура-24°C;
- аэрация 0,1 объем воздуха на 1 объем среды в минуту;
- скорость перемешивания среды – 60 об/мин;
- значение  $pO_2$  - 100% от насыщения;
- давление в ферментере - 0,04 Мпа.

Процесс культивирования проводили при следующих условиях:

- температура 24 °C;
- начальная скорость перемешивания 60 об/мин;
- для поддержания уровня растворенного кислорода скорость перемешивания в течение процесса культивирования увеличивали до 200 – 250 об/мин; концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 50%.



Накопление биомассы сопровождается самопроизвольным снижением рН до 5,0 – 5,2 и дальнейшим подъемом на стадии синтеза до 7,0 – 7,5. В случае, если рН оказывалось выше или ниже установленных границ, его корректировали.

Налипание мицелия на вал мешалки и стенки ферментера устраняли путем изменения (увеличения или уменьшения) скорости перемешивания среды.

В случае нежелательного пенообразования изменяли скорость перемешивания среды или применяли пеногаситель.

Продолжительность ферментации составляла от 72 до 96 часов. Момент окончания процесса определяли по результатам предварительного анализа на содержание целевого и побочных продуктов в культуральной жидкости по данным ВЭЖХВ. Ориентиром также служило резкое снижение дыхания культуры и повышение рН до 7,5, сопровождавшееся пенообразованием.

Культуральная жидкость желтого цвета с сильным грибным запахом.

Микроскопическая характеристика: популяция полиморфна, в основном состоит из уплотненных колоний с выраженной базофилией и отрывков слабо базофильных гиф. Посторонняя микрофлора отсутствует.

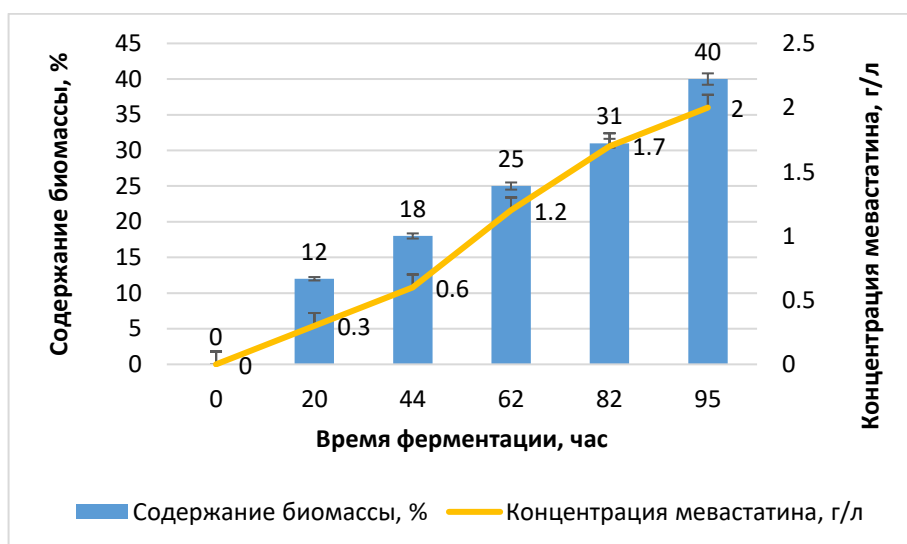


Рисунок 27. Накопление биомассы и мевастатина в культуральной жидкости штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D при культивировании в ферментере объемом 1000 л

В результате масштабирования процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D наибольшая концентрация мевастатина, равная  $2 \pm 0,10$  г/л, была

достигнута на 92 – 96 ч, содержание биомассы соответствовало  $40 \pm 1\%$ . По другим параметрам (рН, рО<sub>2</sub>) процесс культивирования в 1000-литровом биореакторе был аналогичен процессу культивирования в 100-литровом биореакторе.

### 3.8 Получение сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Через 94 – 96 ч роста грибную биомассу инактивировали путем нагрева до 80°C в течение 30 мин непосредственно в ферментационном аппарате. После этого, биомассу переносили в приемник, отделяли от культуральной жидкости путем центрифугирования и лиофильно сушили. Полученную сухую биомассу (БМ) использовали далее для оценки ее противогрибной активности.

Характеристика полученной биомассы представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Основные характеристики сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Наименование параметра	Значение показателей
Внешний вид	Однородный порошок светло-желтого цвета со специфическим запахом
Содержание влаги	не более 5%.
Содержание сырого протеина	не менее 40%
Содержание мевастатина	Не менее 5 г/кг

### 3.9 Определение противогрибного эффекта сухой биомассы *P. chrysogenum* в комбинации с химическими фунгицидами

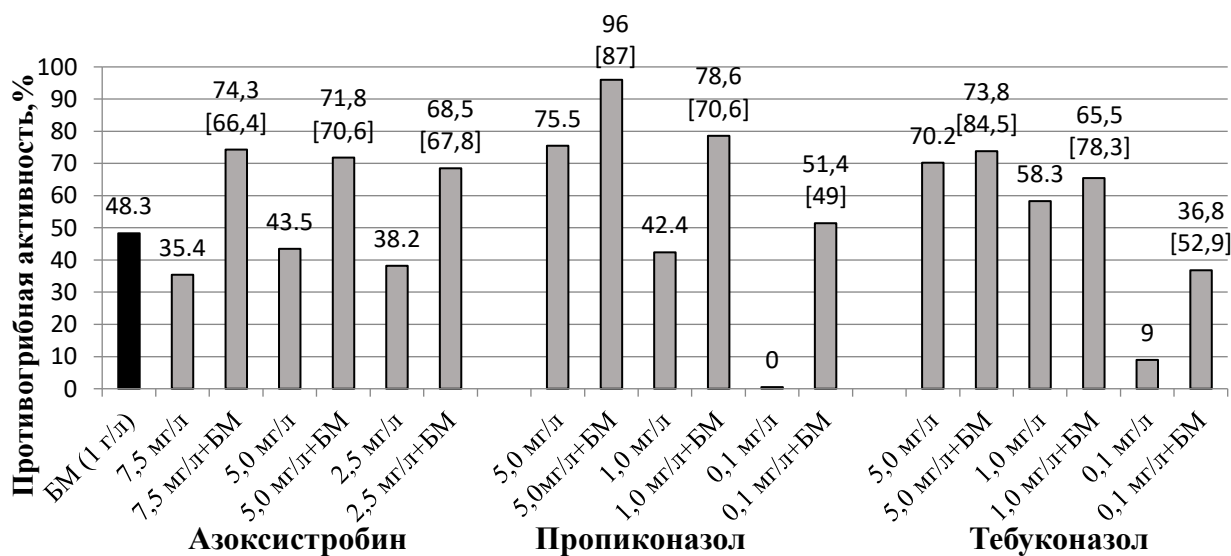
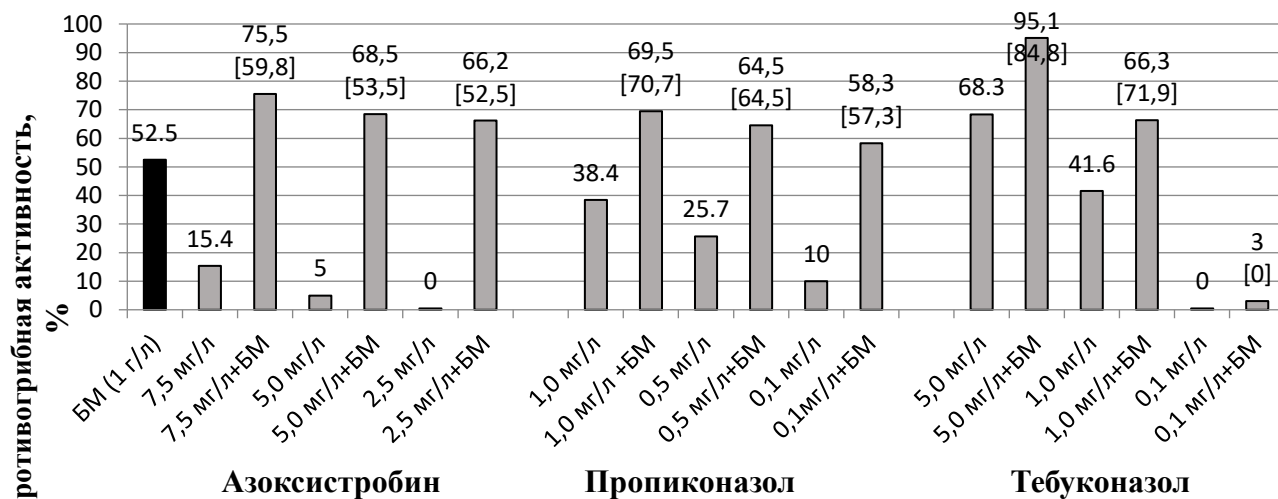
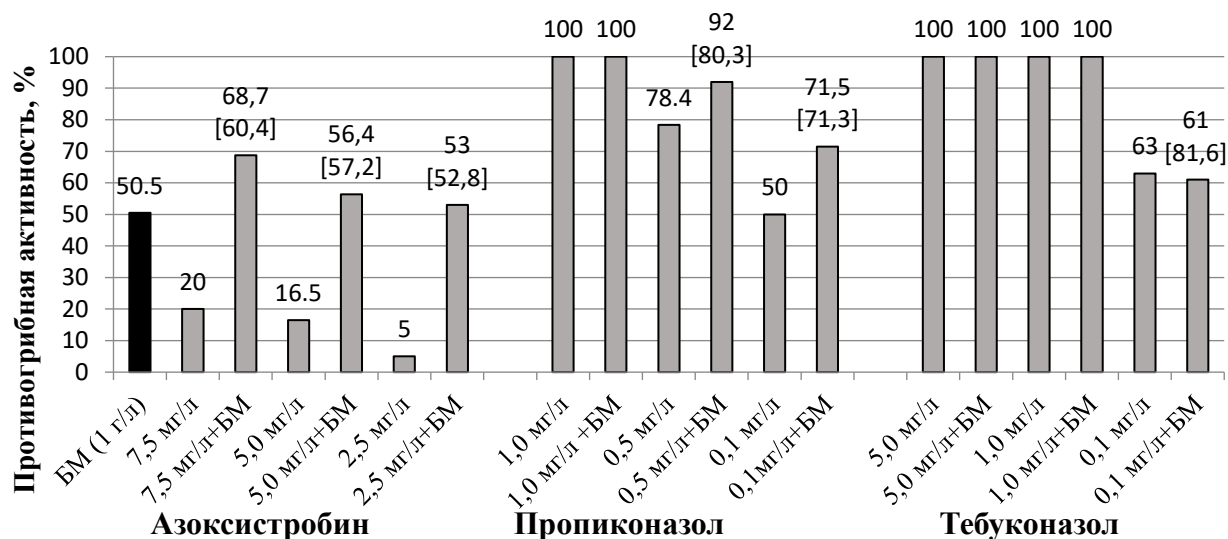
Эффективным методом контроля за фитопатогенными микроорганизмами, вызывающими заболевания сельскохозяйственных растений, является применение химических фунгицидов (Mc Creary С. М., 2016). Тем не менее, согласно данным литературы, результатом длительного использования химических препаратов

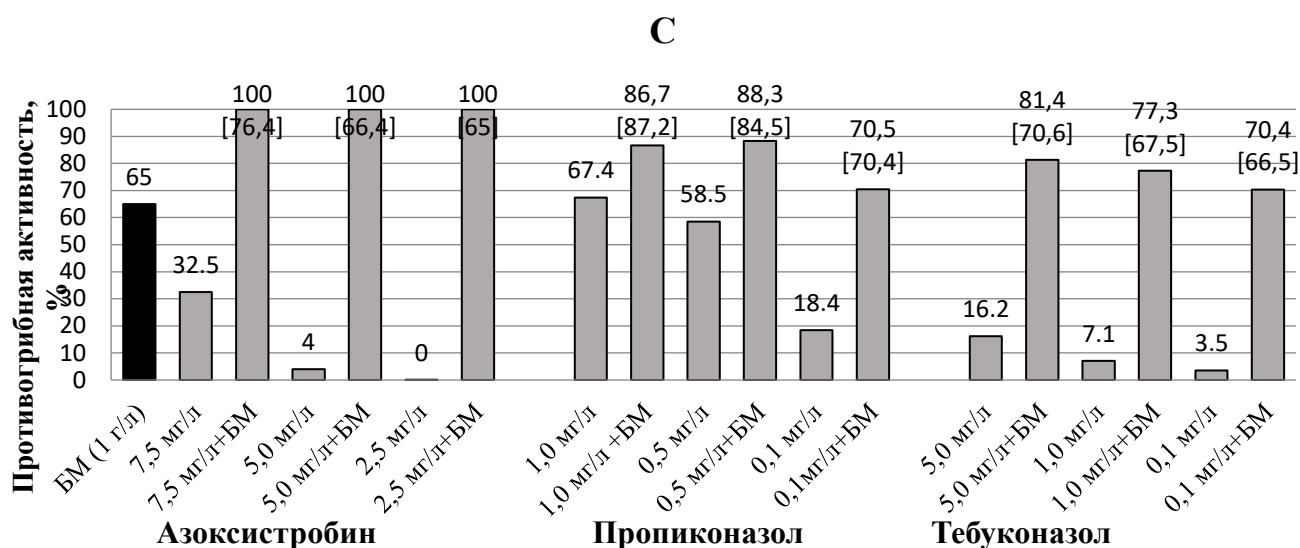
является снижение их эффективности по причине развития устойчивых форм микроорганизмов. А наличие остатков фунгицидов в почве, водоемах и сельскохозяйственной продукции является серьезной угрозой как для человека и животных, так и для организмов, играющих решающее значение при формировании плодородного слоя почвы и ее биоразнообразия (Benedict K., 2016).

Альтернативным способом борьбы с фитопатогенными микроорганизмами, направленным на снижение пестицидной нагрузки на агробиоценозы без потери эффективности, может стать сочетание методов химического и биологического контроля (Shcherbakova L., 2021). Полученный в результате такого совместного применения эффект (синергетический или аддитивный) позволяет уменьшить рабочие дозировки химических препаратов до уровней, при которых они не оказывают какого-либо воздействия на фитопатогены.

В настоящее время в мировой практике ведения сельского хозяйства используется около 150 разнообразных по структуре и механизму действия химических соединений, разделенных на 46 классов (Сидоров Н. М., 2021). В нашем исследовании мы использовали фунгициды двух классов триазолов – пропиконазол, тебуконазол и стробилуринов – азоксистробин, а также их комбинацию в виде двухкомпонентного коммерческого препарата – «Аканто Плюс», содержащего пикоксистробин и ципроконазол.

Результаты исследования противогрибной активности комбинации сухой биомассы *P. chrysogenum* и химических фунгицидов по отношению к тест-культурам представлены на рисунке 28 А, В, С, D.




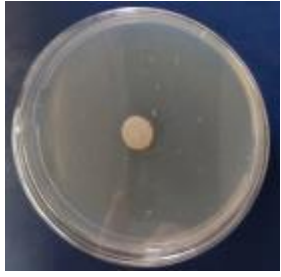

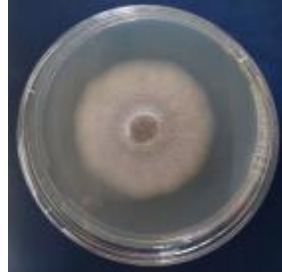

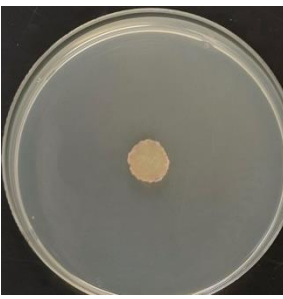


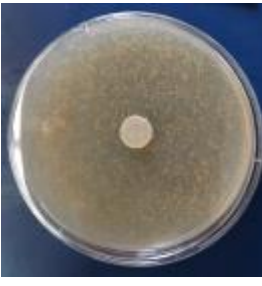
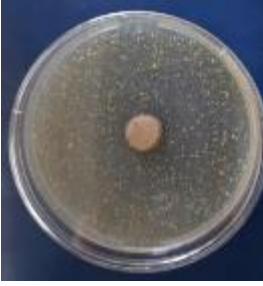
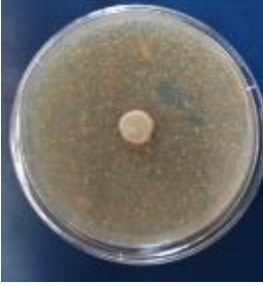

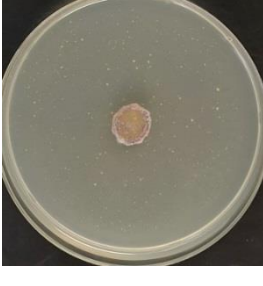
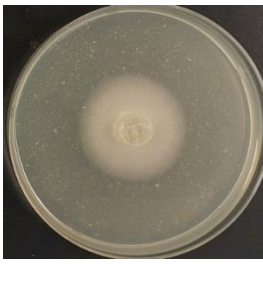



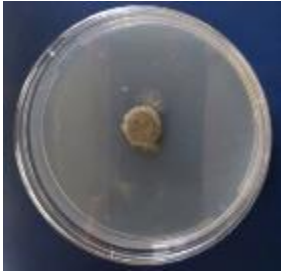


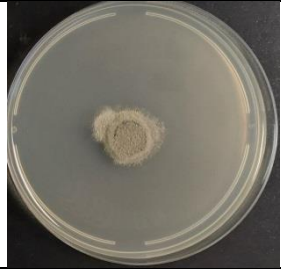

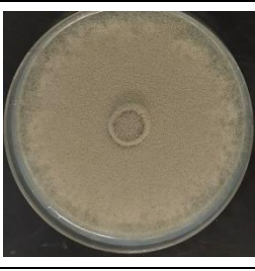
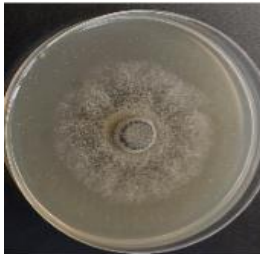
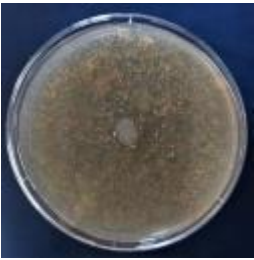



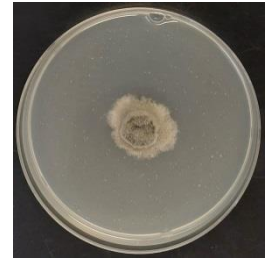

**D**


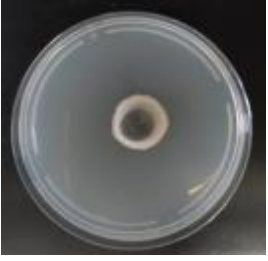

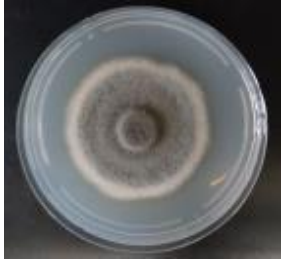
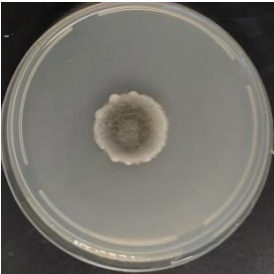
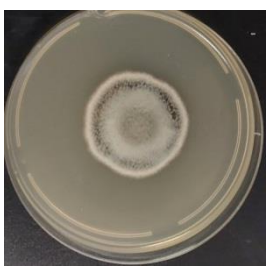
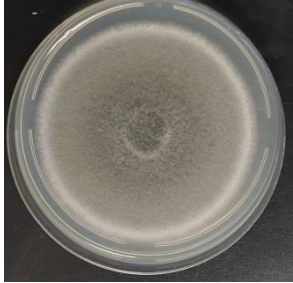
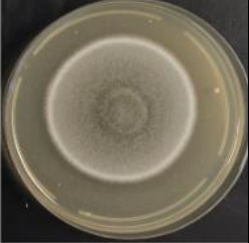


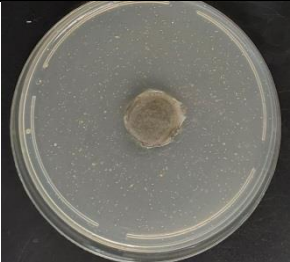
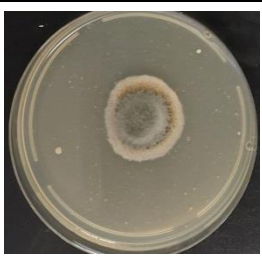
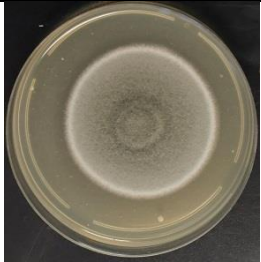
Рисунок 28. Противогрибной эффект биомассы *P. chrysogenum* (7 сутки эксперимента) в комбинации с фунгицидами (азоксистробин, пропиконазол) по отношению к *F. oxysporum* (A), *B. cinerea* (B), *A. solani* (C) и *S. sclerotiorum* (D),

Цифры над диаграммами, обозначают экспериментальное значение противогрибной активности ( $E_R$ ,  $p \leq 0,05$ ), цифры, стоящие в квадратных скобках, соответствуют величине  $E_E$  ( $p \leq 0,05$ ), рассчитанной по формуле Richer *et al.* (1987)

Для изучения эффекта от совместного применения коммерческих фунгицидов и грибной биомассы *P. chrysogenum* использовали метод радиального роста. Метод проиллюстрирован на примере комбинации биомассы *P. chrysogenum* с тебуконазолом и комбинированным препаратом Аканто Плюс (рис. 29).

<i>F. oxysporum</i>				
контроль	концентрация фунгицида в среде, мг/л			
	5	1	0.1	
	Аканто+			
				
	Тебуконазол			
				
	комбинация фунгицида (мг/л) и Б/м			
	Б/м	5+Б/м	1+Б/м	0.1+Б/м
	Аканто+			
				
	Тебуконазол			
				

<i>B. cinerea</i>			
контроль	концентрация фунгицида в среде, мг/л		
	5	1	0.1
	Аканто+		
			
	Тебуконазол		
			
комбинация фунгицида (мг/л) и Б/м			
Б/м	5+Б/м	1+Б/м	0.1+Б/м
	Аканто+		
			
	Тебуконазол		
			

<i>A. solani</i>			
контроль	концентрация фунгицида в среде, мг/л		
	5	1	0.1
	Аканто+		
			
	Тебуконазол		
			
комбинация фунгицида (мг/л) и Б/м			
Б/м	5+Б/м	1+Б/м	0.1+Б/м
	Аканто+		
			
	Тебуконазол		
			

















<i>S. sclerotiorum</i>				
контроль	концентрация фунгицида в среде, мг/л			
	5	1	0.1	
	Аканто+			
				
	Тебуконазол			
				
	комбинация фунгицида (мг/л) и Б/м			
	Б/м	5+Б/м	1+Б/м	0.1+Б/м
		Аканто+		
				
Тебуконазол				
				

Рисунок 29. Противогрибная активность тебуконазола, Аканто Плюс, биомассы *P. chrysogenum* и их комбинации в отношении тест-культур, 7 сутки инкубирования

Еще одним инструментом для решения проблемы резистентности микроорганизмов в отношении химических противогрибных препаратов, является применение комбинации действующих веществ с различным механизмом действия.

Комбинированные фунгициды зачастую отличаются более длительной защитой сельскохозяйственных культур, поскольку один компонент может обладать лечебным действием, а другой – профилактическим.

Для исследования совместного применения комбинированного фунгицида с биомассой *P. chrysogenum* был использован двухкомпонентный коммерческий препарат, в состав которого входили пикоксистробин и ципроконазол. Концентрацию, которую использовали в эксперименте, рассчитывали с учетом суммарного содержания действующих веществ в препарате.

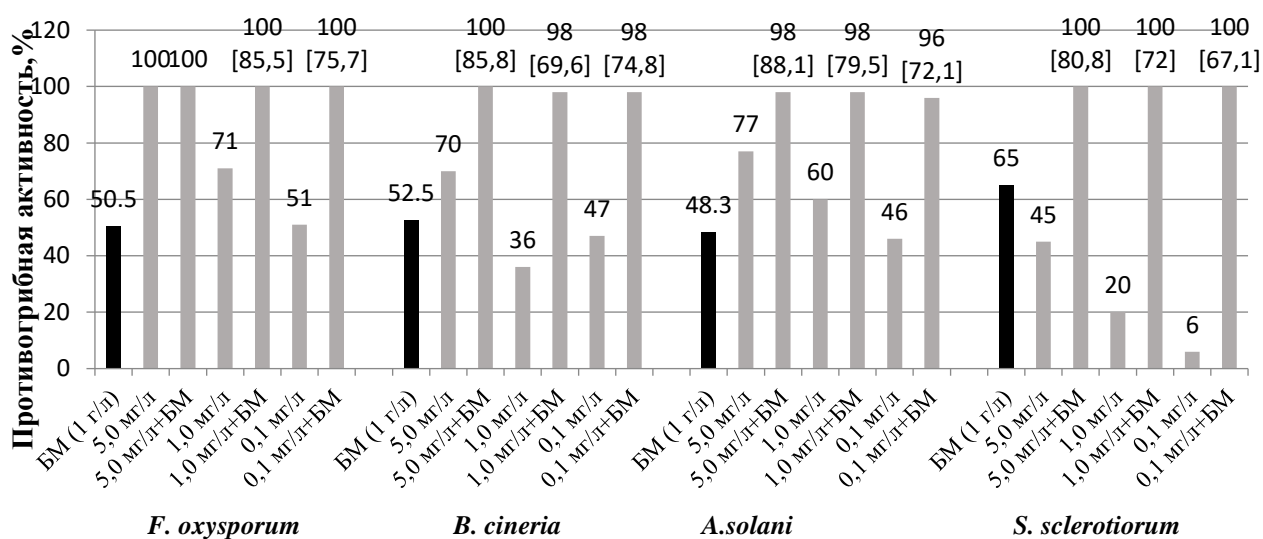


Рисунок 30. Противогрибной эффект биомассы *P. chrysogenum* (7 сутки эксперимента) в комбинации с двухкомпонентным коммерческим препаратом Аканто Плюс по отношению к *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. solani* и *S. sclerotiorum*.

Цифры над диаграммами, обозначают экспериментальные значения противогрибной активности (E<sub>R</sub>, p ≤ 0,05), цифры, стоящие в скобках, соответствуют величине E<sub>E</sub> (p ≤ 0,05), рассчитанной по формуле Richer et al. (1987)

В процессе исследования было определено, что выбранные тест-культуры обладают неодинаковой чувствительностью как к сухой биомассе *P. chrysogenum*, так и использованным фунгицидам. На 7 сутки эксперимента противогрибное действие сухой биомассы, внесенной в ростовую среду в количестве 1 г/л, находилось в пределах 48,3 – 65%. В процессе исследования также был установлен факт, что для тех вариантов доз фунгицидов, где наблюдалось минимальное ингибирование роста и развитие фитопатогена, при их применении совместно с сухой биомассой происходило значительное подавление развития микроорганизма.

Максимальный противогрибный эффект был продемонстрирован при применении двухкомпонентного коммерческого препарата в комбинации с биомассой *P. chrysogenum* во всем диапазоне исследуемых концентраций препарата в отношении всех тест -культур. Противогрибная активность составила 96-100% (Рис.30).

Таким образом, анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в процессе экспериментальной работы при совместном применении фунгицидов и биомассы гриба установлен аддитивный, те равный или незначительно превышающий теоретически рассчитанный ( $E_E$ ) противогрибной эффект ( $E_R = E_E$ ).

Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования комбинации сухой биомассы и фунгицидов для контроля за заболеваемостью сельскохозяйственных культур при низких концентрациях химических препаратов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди микроорганизмов, перспективных для создания биопрепаратов с противогрибной активностью, особый интерес представляют штаммы, принадлежащие к роду *Penicillium* и синтезирующие разнообразные по своей структуре и спектру противомикробного и противовирусного действия биологически активные вещества (Hegedűs N., 2011), (Nicoletti R., 2016), (Ma H.-G., 2016). В связи с чем, разработанные на основе грибов рода *Penicillium* препараты могут быть использованы в интегрированных системах защиты растений (Hegedűs N. 2011.), (Nguyen P.-A., 2017.). Учитывая вышесказанное, особенно актуальной становится разработка технологии получения сухой биомассы *P. chrysogenum* и оценке его противогрибной активности.

Разработка высокоактивных штаммов микроорганизмов подразумевает получение в течение короткого периода времени штамм, характеризующийся высокой скоростью и стабильностью биосинтеза целевых метаболитов, обуславливающих целевую активность. В настоящее время основным способом получения высокопродуктивных штаммов являются методы генетической инженерии. Однако, получение таких продуцентов все еще остается сложной процедурой, а надежность продуцента в дальнейшей перспективе всегда остается под вопросом из-за вероятности утраты новообретенной биологической активности. Кроме того, в случае создания штаммов, которые могут быть использованы в составе средства для защиты растений, генетически модифицированные микроорганизмы не подходят вследствие существующих запретов на применение подобного рода микроорганизмов на законодательном уровне. Поэтому микроорганизмы со способностью к повышенному уровню биосинтеза биологически активных веществ чаще получают путем индукции соответствующих мутаций, применяя методы физического или химического мутагенеза и последующей селекции.

Представленная диссертационная работа состояла из нескольких этапов. Сначала с применением методов УФ – мутагенеза и последующей селекции был получен штамм *P. chrysogenum*, обладающий антагонистической активностью к

выбранным тест – культурам (*F. oxysporum*, *A. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*). Следует еще раз подчеркнуть, что в основе проводимого в данном исследовании селекционного отбора было положено увеличение степени ингибирования тест-культур получаемыми штаммами *P. chrysogenum*. Безусловно, данный способ селекции не лишен субъективизма. Тем не менее, факт корреляции изменения уровня продуктивности целевого продукта и морфологических признаков штамма подтверждается имеющимися литературными данными (Shahid MG., 2020). Полученный штамм был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером *P. chrysogenum* ВКПМ А-4876D.

Наличие противогрибного эффекта у *P. chrysogenum* ВКПМ F-4876D может быть обусловлено содержанием разнообразных по своей природе и обладающих фунгицидным действием метаболитов (Nicoletti R., 2016), (Hegedús N., E. Leiter. 2011). Так, согласно литературным данным, выделенные из *P. chrysogenum* протеины PAF и PAFB представляют собой небольшие катионные, богатые цистеином белки, которые обладают высокой стабильностью к pH, высоким температурам и протеолизу, демонстрируют высокую ингибирующую активность в отношении широкого спектра патогенных грибов в микромолярных концентрациях и обладают противовирусным действием, не отягощенным цитотоксическим воздействием на клетки млекопитающих в *in vitro* и *in vivo* экспериментах (Binder U., 2010), (Huber A., 2020). В основе механизма действия вышеуказанных белков лежит гиперполяризация плазматической мембраны, в результате чего происходит нарушение гомеостаза и осмотического баланса в клетке. Результатом активации ионных каналов и последующего увеличения концентрации активных форм кислорода в клетке является индукция апоптоза (Huber A., 2020). Высокая стабильность PAF и PAFB при высоких температурах и в широком диапазоне pH делает их подходящими терапевтическими средствами для использования в медицине, защите растений и пищевых продуктов. Согласно данным проведенного в данной диссертационной работе SDS-ПААГ электрофореза, выделенные и очищенные белки *P. chrysogenum* соответствуют двум зонам, 10-12 кДа (зона I) и 35 кДа (зона II).

Зона I соответствует белкам с молекулярной массой 10-12 кДа. Согласно литературным данным (Rodríguez-Martín A., 2010), в этой зоне могут находиться белки группы PAF, имеющих молекулярную массу 6,5-10 кДа. Проведенная оценка метаболической активности *B. cinerea* и *F. oxysporum* при инкубации в присутствии данных белков *P. chrysogenum* подтвердила их способность ингибировать рост и развитие выбранных тест-культур, что может являться подтверждением наличия данной группы белков в получаемой сухой биомассе. Зона II соответствовала маркерным белкам 35 кДа. Из литературных источников нам известно, что штамм *P. chrysogenum* помимо низкомолекулярных пептидов синтезирует и гликолизированные белки молекулярной массой 35-37 кДа, обладающие хитиназной и хитозаназной активностью (обозначаемые как PgChP). Данная активность сухой биомассы в представленной диссертационной работе исследована не была, поскольку не стояла задача изучения механизма действия получаемой сухой биомассы.

В работе Shcherbakova et al. , было установлено, что 6-деметилмевинолин (6-ДММ), продуцируемый *P. citrinum*, влияет как на рост колоний, так и на прорастание конидий *A. solani*, *A. alternata*, *P. nodorum* *R. solani* и четырех видов *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*), образующих вместе с *B. sorokiniana* комплекс корневых гнилей пшеницы. Как и триазолы (DMI-фунгициды), 6-ДММ подавляет синтез стероидов, составляющих основу грибной клеточной стенки. Однако, в отличие от DMI-фунгицидов, он действует на фермент 3-окси-3-метилглутарил-СоА-редуктаза, контролирующей одну из начальных реакций процесса биосинтеза стероидных соединений в клетке грибов (Shcherbakova L.A., 2019). В представленной диссертационной работе в культуральной жидкости *P. chrysogenum* был идентифицирован мевастатин, присутствие которого в получаемой сухой биомассе также может быть связано с ее противогрибными свойствами. Кроме того, наличие мевастатина в сухой биомассе являлось своеобразным маркером эффективности получаемой сухой биомассы.

В биотехнологическом процессе, основанном на использовании высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, основная задача заключается не

только в создании этих продуцентов и обеспечении их жизнедеятельности, но и в определении оптимальных условий для их роста и развития. Следующий этап работы состоял в определении основных источников азота, углерода и макроэлементов для успешного протекания процесса роста и накопления биомассы *P. chrysogenum*. Итогом данной работы была разработка состава питательной среды, позволяющей за 92-96 ч культивирования получать  $40 \pm 1\%$  сырой биомассы, содержащей  $1.9 \pm 0.10$  г/л мевастатина.

Следующий этап диссертационной работы был посвящен разработке эффективной технологии получения сухой биомассы *P. chrysogenum*, что также предполагало проведение масштабирования культивирования штамма в биореакторах.

Культивирование *P. chrysogenum* в режиме регистрации основных параметров было выполнено в ферментационной установке объемом 15 л. Была показана зависимость накопления грибной биомассы и мевастатина от уровня pH среды и степень ее насыщения кислородом. Подобранные условия ферментации *P. chrysogenum* в 15 л ферментационной установке (значение pH,  $pO_2$ ) позволили далее провести апробирование и масштабирование процесса и выполнить культивирование штамма в биореакторах, объем которых соответствовал 100 л и 1000 л. Также была подготовлена соответствующая техническая документация, необходимая для успешного проведения процесса ферментации *P. chrysogenum*.

Заключительным этапом работы являлось определение противогрибного эффекта полученной сухой биомассы *P. chrysogenum* в комбинации с химическими фунгицидами по отношению к тест-культурам (п. 2.1.2).

В результате экспериментальной работы можно сделать вывод о том, что наиболее эффективными, т.е. значительно ингибирующими рост *S. sclerotiorum* являются комбинации БМ (1 г/л) и азоксистробина (7,5 мг/л) и БМ (1 г/л) и пропиконазола (1 мг/л). Для комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) в течение 7 суток эксперимента зарегистрировано полное (100%) ингибирование

роста *S. sclerotiorum*, для комбинации БМ (1 г/л) + пропиконазол (1 мг/л) ингибирование составило (87,2%).

Установлено что наиболее эффективными вариантами, ингибирующими рост *A. solani*, являются комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) и БМ (1 г/л) + пропиконазол (5 мг/л). Для комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) в течение 7 суток эксперимента степень ингибирования *A. solani* составила (74,3%).

Для сочетания БМ (1 г/л) и пропиконазола (5 мг/л) установлено значительное (96%) подавление роста фитопатогена.

По отношению к *F. oxysporum* установлено что наиболее эффективными вариантами, ингибирующими рост являются комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) и БМ (1 г/л) + пропиконазол (1 мг/л). Для комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) в течение 7 суток эксперимента степень ингибирования *F. oxysporum* составила 68,7%.

Для комбинации БМ (1 г/л) + пропиконазол (1 мг/л) зарегистрировано полное (100%) ингибирование роста.

Отмечено, что наиболее эффективными вариантами, ингибирующими рост *B. cinerea*, являются комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) и БМ (1 г/л) + пропиконазол (1 мг/л). Для комбинации БМ (1 г/л) + азоксистробин (7,5 мг/л) в течение 7 суток эксперимента степень ингибирования *B. cinerea* составила 75,5%.

Для комбинации БМ (1 г/л) + пропиконазол (1 мг/л) степень ингибирования патогена составила 69,5%.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание промышленной технологии получения биологически активных соединений, в первую очередь, предполагает разработку высокопродуктивных и стабильных штаммов-продуцентов. А во-вторую, с целью увеличения объемов производимого продукта, проводят масштабирование технологии от лабораторных условий до производственных масштабов. При этом, необходимо обязательное соблюдение условия сохранения продуктивности штамма-продуцента и поддержание заданного качества целевого продукта (Schmidt F.R., 2005).

Представленные в данной диссертационной работе результаты исследования позволяют заключить, что в итоге многоступенчатой селекции и применения УФ-мутагенеза получен новый штамм *P. chrysogenum*, синтезирующий биологически активные вещества, в том числе мевастатин, в повышенных концентрациях, по сравнению с исходным коллекционным штаммом. Следовательно, повышается эффективность его применения для борьбы с грибковыми патогенами растений.

В результате проведенного исследования были получены следующие результаты:

1. Получен штамм *P. chrysogenum*, обладающий повышенной противогрибной активностью. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером F-4876D и запатентован.

2. Разработан состав питательной среды, который способствует получению значительного выхода биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D обладающего противогрибковой активностью. В частности:

- подобран источник углерода (сахар – 100г/л),
- подобраны источники азота (сухое обезжиренное молоко-10г/л).

3. Определены оптимальные условия и параметры для культивирования штамма в ферментационных установках:

- Определен оптимальный уровень кислотности среды (6,8-7,0), способствующий интенсивному накоплению биомассы продукта и высокому уровню биосинтеза мевастатина.

- Определено оптимальное значение  $pO_2$  в среде (30-50%).

4. Проведен процесс масштабирования культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в биореакторе объемом 1000 л, что подтверждает возможность применения разработанной технологии получения биомассы и биосинтеза мевастатина в промышленном масштабе.

5. Установлено противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по отношению к тест-культурам (*F. oxysporum*, *A. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*). На 7 сутки эксперимента противогрибное действие сухой биомассы, внесенной в ростовую среду в количестве 1 г/л, находилось в пределах 48,3 – 65%.

6. Показан аддитивный фунгицидный эффект при применении комбинации сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и химических фунгицидов – азоксистробина, пропиконазола, тебуконазола и Аканто +.

Культивирование *P. chrysogenum* в режиме регистрации основных параметров было выполнено в ферментационной установке объемом 15 л. Была показана зависимость накопления грибной биомассы и мевастатина от уровня pH среды и степень ее насыщения кислородом. Подобранные условия ферментации *P. chrysogenum* в 15 л ферментационной установке (значение pH,  $pO_2$ ) позволили далее провести масштабирование процесса и выполнить культивирование штамма в биореакторах, объем которых соответствовал 100 л и 1000 л. Также была подготовлена соответствующая техническая документация, необходимая для успешного проведения процесса ферментации *P. chrysogenum*.

Полученные данные отражают высокий потенциал разработки эффективного и экологически безопасного биопрепарата, который может быть использован в интегрированных системах защиты растений от фитопатогенов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФИЦ – Федеральный исследовательский центр

РАН – Российская академия наук

ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов

ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ – Центр коллективного пользования «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов-идентификаторов (дифференциаторов) патогенных штаммов микроорганизмов» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»

АМП – Антимикробные пептиды

КГА – Картофельно-глюкозный агар

УФ – ультрафиолетовое излучение

КЖ – культуральная жидкость

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

pH – показатель кислотности

pO<sub>2</sub> – показатель концентрации растворенного кислорода.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян В. Б. Перспективы применения ультразвука для управления процессами роста в биопленках/ В. Б. Акопян, Н. А. Загустина, В. А. Филатова // Международная научно-практическая конференция Фармацевтические и медицинские биотехнологии: сборник научных статей.- М.- 2012.- С. 311.
2. Акопян В. Б. Пути развития ультразвуковых биомедицинских исследований/ Акопян В. Б.// Физические методы исследований в медицине в : сборник научных статей/ Тбилиси 26-29 октября 2011.
3. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978 .– 464 с.
4. Билай В.И. Основы общей микологии: Учебник для биологических факультетов университетов/ В.И. Билай.– К.: Выща шк. Головное изд-во, 1989. – 392 с.
5. Бирюков, В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере – М.: Наука, 1985. – 296 с.
6. Бурова Ю. А. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств/ Ю. А. Бурова, С. А. Ибрагимова, В. В. Ревин // Вестник ОГУ.- 2012.- №10 (146).- URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-bakterialnoy-suspenzii-pseudomonas-aureofaciens-2006-na-melasse-i-izuchenie-nekotoryh-ee-svoystv>.
7. Виестур У.Э. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура: книга/ У.Э. Виесту.- Рига: Зинатне.- 1987.-263р.
8. Влияние источников азота на накопление и белковость биомассы *Chlorella Vulgaris* IPPAS С-2019/ А. В. Митишев, Е. Ф. Семенова, Е. Е. Курдюков [и др.] // Вестник ПензГУ.- 2021.- №4 (36).- URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-istochnikov-azota-na-nakoplenie-i-belkovost-biomassy-chlorella-vulgaris-ippas-s-2019>.

9. Волова Т. Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : - Красноярск.: ИПК СФУ, 2008. - (Введение в биотехнологию : УМКД № 143-2007 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова).
10. Груздев Г.С. Химическая защита растений/ Г.С. Груздев, В.А. Зинченко, В.А. Калинин, Р.И. Словцов.- 2-е изд., перераб. и доп.- Агропромиздат, 1980 .– с. 428-437.
11. Дьяков Ю.Т. Введение в генетику грибов: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. Заведений/ Ю.Т. Дьяков, А.В. Шнырева, А.Ю. Сергеев .- М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 304 с.
12. Квеситадзе Г. И. Введение в биотехнологию : учебное пособие / Г.И. Квеситадзе, А.М. Безбородов// Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН.- Москва, 2002. – 284 с.
13. Лутова Л.А. Получение мутантов растений с измененным составом фитостеринов, обладающих устойчивостью к насекомым. Создание лабораторной модели «растение – насекомое»/ Л.А. Лутова, Л.В. Бондаренко, О.Г. Козырева, С.Г. Инге-Вечтомов// Вестник Ленинградского университета. – Сер.3. – вып.2. – №10.- 1990.– С. 82-87.
14. Матвеев В. Е. Научные основы микробиологической технологии // М: Агропромиздат. 1985. – 224 с.
15. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов .– М.: Легкая и пищевая промть, 1982. – 264 с.
16. Оценка противогрибной активности биомассы штамма *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-4876 D по отношению к возбудителям альтернариоза / А. Хатем, А. Н. Смирнов, В. В. Джавахия [и др.] // Достижения науки и техники АПК.- 2023.- Т. 37. -№. С.- doi: 10.53859/02352451\_2023\_37\_0\_0.
17. Оценка фунгицидной активности препаратов для предпосевной обработки семян озимой пшеницы/ Н. М. Сидоров, Е. А. Гырнец, М. М. Астахов [и др.]// Таврический вестник аграрной науки.- 2021.- № 4(28).- С. 149–158.- DOI: 10.33952/2542-0720- 2021-4-28-149-158.

18. Патент № 124678. Установка для промежуточного фильтрования биотехнологической рабочей среды, опубликовано: 05.09.2012/ Акопян В.Б., Ступин А. Ю., Афонин А.И., Бамбура М. В., Пашинин А.Е., Ребизов В.Ю., Хаматаев Р.В.

19. Патент № 124679. Установка консервирования раствора сахаров для защиты от микробного обсеменения, опубликовано: 05.09.2012/ Акопян В.Б., Ступин А. Ю., Афонин А.И., Бамбура М. В., Пашинин А.Е., Ребизов В.Ю., Хаматаев Р.В.

20. Патент № 2245915. Аппарат для культивирования микроорганизмов, опубликовано: 10.02.2005/ Редикульцев Ю.В.

21. Патент № 1414. Способ очистки вирусов с помощью хроматографии, опубликовано: 26.02.2001/ Фанже Бернар, Франсон Ален.

22. Патент № 2373273. Устройство для непрерывной культуры с мобильным сосудом, позволяющим выполнять отбор наиболее подходящих вариантов клеток, опубликовано: 20.11.2009/ Де Креси Юд Франсуа Мари.

23. Патент № 2433179. Способ удаления S-белков с поверхности пурпурных мембран, 201/ Складнев Д.А., Акопян В.Б.

24. Патент № 2540019. Биореактор, опубликовано: 27.01.2015 / Ямпиров С. С., Друзьянова В. П., Кобякова Е. Н., Семенова О. П.

25. Патент № 3708. Способ разделения и/или выделения протеинов плазмы методом кольцевой хроматографии, опубликовано: 28.08.2003/ Бухахер Андреа, Йосик Дьюро, Вольфганг Юрген, Приор Адальберт, Грубер Герхард, Иберер Гюнтер.

26. Патент № 9592. Биореактор для промышленного глубинного культивирования микроорганизмов, опубликовано: 30.10.2013/ Табала К. Б., Табала В. К., Мурашко А.С., Мурашко С. П.

27. Патент № U 9660. Биореактор для промышленного глубинного культивирования мезофильных микроорганизмов, опубликовано: 30.10.2013/ Мурашко С. П., Табала В. К., Мурашко А. С., Табала К. Б.

28. Патент № U 9850. Биореактор для промышленного глубинного культивирования микроорганизмов: опубликовано: 30.12.2013/ Мурашко А. С., Гракович В. И., Мурашко С. П.
29. Перт С. Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Д. Перт – М.: Мир, 1978. – 333 с.
30. Технологические машины и оборудование биотехнологий : учебник // Г. В. Алексеев, В. Т. Антуфьев , Ю. И. Корниенко [и др.]. СПб.: ГИОРД, 2015.
31. Шарипова А. Р. Методы выделения и очистки биотехнологической продукции/ А. Р. Шарипова // Science Time.- 2016.- №9 (33).- URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metody-vydeleniya-i-ochistki-biotehnologicheskoy-produktsii>.
32. Шарова Н. Ю. Динамика биосинтеза бета-глюканов микроорганизмами *Aspergillus niger*, *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе их культивирования на различных средах/ Н. Ю. Шарова, Б. С. Манжиева // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств».- 2020.- №2 (44).- URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/dinamika-biosinteza-beta-glyukanov-mikroorganizmami-aspergillus-niger-streptomyces-lucensis-i-streptomyces-violaceus-v-protssesse-ih>.
33. Широких И.Г. Влияние источников азота в питательной среде на рост и целлюлазную активность стрептомицетов/ И.Г. Широких, Н.А. Боков, Я.И. Назарова // Известия Коми НЦ УрО РАН.- 2021.- №5 (51).- URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-istochnikov-azota-v-pitatelnoy-srede-na-rost-i-tsellyulaznuyu-aktivnost-streptomitsetov>.
34. Щербаков М.Г. Влияние состава питательных сред на протеолитическую активность глубинных культур *Bacillus subtilis* ВКПМ 2335 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 2336 / М.Г. Щербаков, А.А. Ильязов, М.Ю. Шапошникова // Биопрепараты: профилактика диагностика лечение. –2014. – № 1 (49). – С. 36-39.

35. A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater/ S. G. Shin, G. Han, J. Lim [et al.] // Water Res.- 2010.- 44.- P. 4838-4849.
36. A *Penicillium chrysogenum* based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses/ C. Sonderegger, L. Galgóczy, S. Garrigues [et al.] // Microb. Cell Factories.- 2016.- 15.- P. 192.- URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0586-4>.
37. A silent antifungal protein (AFP)-like gene lacking two introns in the mould *Trichoderma viride*/ J.J. Hao, J.Q. Ye, Q. Yang [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2000. – V. 1475. – P. 119–124.
38. Abada E.A. Antimicrobial activity of *Bacillus circulans* isolated from rhizosphere of *Medicago sativa* / E.A. Abada, H.H. El-Hendawy, M.E. Osman, M.A. Hafez // Life Science Journal. – 2014. – № 11(8). – P. 711-719.
39. Abdel-Aziez S. M. Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *azotobacter* as N<sub>2</sub> biofertilizer/ S. M. Abdel-Aziez, W. E. Eweda, M. G. Girgis, B. F. Ghany // Annals of Agricultural Sciences.- 2014.- Vol. 59.- P. 95-108.
40. Alibaba : [сайт] . - URL: <https://russian.alibaba.com/product-detail/High-quality-top-selling-Penicillium-citrinum-62011019169.html>.
41. Antifungal activity of myriocin against *Fusarium graminearum* and its inhibitory effect on deoxynivalenol production in wheat grains/ J. Shao, Z. Pei, H. Jing [et al.] // Physiological Mol Plant Pathology.- 2021. – V. 2021 – P. 101635.
42. Antifungal activity of the dry biomass of *Penicillium chrysogenum* F-24-28 and its application in combination with azoxystrobin for efficient crop protection./ N.V. ,Karpova V.V. Yaderets, E.V. Glagoleva [et al.]// Agriculture.- 2021.- 11.- P. 935.
43. Antifungal Peptides and Proteins to Control Toxigenic Fungi and Mycotoxin Biosynthesis/ P. V. Martínez-Culebras, M. Gandía, S. Garrigues [et al.] // Int. J. Mol. Sci.- 2021.- 22(24).-P. 13261.-URL: <https://doi.org/10.3390/ijms222413261>.



44. Application of organic acids for plant protection against phytopathogens/ I.G. Morgunov, S.V. Kamzolova , E.G. Dedyukhina [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2017. - V. 101. - P. 921–932.
45. Avermectins: Novel insecticides, acaricides and nematocides from a soil microorganism/ I. Putter, J. G. Mac Connell, F. A. Preiser, A. A. Haidri [et al.] // *Experientia.*- 1981.- Vol. 37.- P. 963-964.
46. Benedict K. Invasive Fungal Infections Acquired from Contaminated Food or Nutritional Supplements: A Review of the Literature/ K. Benedict, T.M. Chiller, R.K. Mody .- *Foodborne Path. Disease*, 2016. - V. 13. - Is. 7. – P. 343-349.
47. Benedict K. Invasive Fungal Infections Acquired from Contaminated Food or Nutritional Supplements: A Review of the Literature/ K. Benedict, T. M. Chiller, R. K. Mody // *Foodborne Path. Disease.*- 2016.- V. 13.- Is. 7.
48. Binder U. The Antifungal Activity of the *Penicillium chrysogenum* Protein PAF Disrupts Calcium Homeostasis in *Neurospora crassa*/ U. Binder, M. Chu, N. D. Read, F. Marx // *Eukaryot Cell.*- 2010 Sep.- 9(9).-P. 1374–1382.
49. Biological control of *Fusarium* wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1/ X. Zhao , X. Liu, H. Zhao [et al.] // *Biological Control.* - 2021. - V. 158. – P. 104601.
50. Biological importance of microbes in agriculture, food and pharmaceutical industry: A Review/ M. Kalsoom, F. UR Rehman, T. Shafique [et al.]// *Innovare Journal of Life Sciences.*- 2020.-Vol. 8.- P. 1-4.- doi. 10.22159/ijls.2020.v8i6.39845.
51. Buda De Cesare G. Antimicrobial Peptides: A New Frontier in Antifungal Therapy/ G. Buda De Cesare, S.A. Cristy, D.A. Garsin, M.C. Lorenz // *mBio.*- 2020.-11.- e02123-20.
52. Cal A. De. Management *Fusarium* wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*/ A. De. Cal, A. Szejnberg, P. Sabuquillo, P. Melgarejo// *Biological Control.* - 2009. - V. 51. - Is. 3. - P. 480-486.
53. Campbell B. C. Chemosensitization as a mean to augment commercial antifungal agents/ B. C. Campbell, K. L. Chan, J. H. Kim // *Frontiers in Microbiology.* - 2012. - V. 3. - Is. 79 - . P. 1-20.

54. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*/ A. Martinez-Ruiz, A. Martinez del Pozo, J. Lacadena [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1997. – V. 1340. –P. 81–87.
55. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity/ C. Bormann, D. Baier, I. Horr [et al.] // *J Bacteriol.* – 1999. –V. 181. –P. 7421–7429.
56. Characterization of the gene encoding alpha-sarcin, a ribosomeinactivating protein secreted by *Aspergillus giganteus*/ S. Wnendt, H. Felske-Zech, P. P. C. Henze [et al.] // *Gene.* –1993. –V 124. – P. 239–244.
57. Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*/ A. Rodríguez-Martín, R. Acosta, S. Liddell [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2010. – V. 88. – Is. 2 – P. 519-528.
58. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12/ K. Kim, Y. Lee, A. Ha, J. I. Kim [et al.]// *Front Plant Sci.* - 2017. - V. 8. - P. 2010.
59. Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides/ V. Dzhavakhiya, L. Shcherbakova, Y. Semina [et al.] // *Frontiers in Microbiology.* - 2012. – V. 3. - P. 87.
60. Chen W. -C. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms / W.-C. Chen, R.-S. Juang, Y.-H. Wei // *Biochemical Engineering Journal.* – 2015. – № 103. – P. 158-169.
61. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* PAF gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity/ F. Marx, H. Haas, M. Reindl [et al.] // *Gene.* –1995. –V. 167. – P. 167–171.
62. Complete nucleotide sequence of cDNA for the cytotoxin alpha sarcin/ T. Oka, Y. Natori, S. Tanaka [et al.] // *Nucleic Acids Res.* –1990. –V. 18. –P. 1897.
63. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects/ Komárek M., E. Čadková, V. Chrastný [et al.] // *Environment International.* - 2010. - V. 36. - Is. 1. - P. 138-151.

64. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*/ A. G. Brown, T. C. Smale, T. J. King [et al.] // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.- 1976.-V. 1 (11).- P. 1165–1170.- doi:10.1039/P19760001165. PMID 945291.
65. Diaz de Velegas M. Influencia del pH y la temperatura en la produccion de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Evaluacion de su efectividad en el control de malezas / M. Diaz de Velegas, A. Garsia, B. Seijas // Fitosanidad. – 2005. – Vol. 9. – №3. – P. 41-49.
66. Dogsa I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms [электронный ресурс] / I. Dogsa, M. Brložnik, D. Stopar, I. Mandić-Mulec // PLoS ONE 8(4). – 2013. – 10 p.
67. Dubey N.K. Natural products in plant pest management: book/ N.K. Dubey.- Centre for Advanced Studies in Botany Banaras Hindu University: Varanasi. - India. - 2010. 293p.
68. Dzhavakhiya V.V. Lovastatin influence on phytopathogenic fungi/ V.V. Dzhavakhiya, G.G. Petelina // Agro XXI.- 2008.-V. 4–6,-P. 33–35.
69. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial/ S.C. Wu, Z. H. Cao, Z.G. Li [et al.]// Geoderma.- 2005.-Vol. 125.- P. 155-166.
70. Einfeld K. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast/ K. Einfeld, F. Riffer, J. Mentges, M. J. Schmitt // Mol Microbiol. – 2002. –V. 37. – P. 926–940.
71. Emerging oomycete threats to plants and animals/ L. Derevnina, B. Petre, R. Kellner [et al.] // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2016. – V. 371 (1709). - P. 20150459.
72. Endo A. ML-236 A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*/ A. Endo, M. Kuroda, Y. Tsujita// The Journal of Antibiotics.- 1976.- V. 29 (12).- P. 1346–1348. doi:10.7164/antibiotics.29.1346. PMID 1010803.

73. Endo A. The origin of the statins// *Atherosclerosis. Supplements.*- 2004.-V. 5 (3).- P. 125–130.- doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.033. PMID 15531285.
74. Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain / C. R. Davies, F. Wohlgemuth, T. Young [et al.] // *Fungal Biology Reviews.* - 2021. - V. 36. - P. 15-26.
75. Fernandez-Luna J. L. Complete amino acid sequence of the *Aspergillus* cytotoxin mitogillin/ J. L. Fernandez-Luna, C. Lopez-Otin, F. Soriano, E. Mendez // *Biochemistry.* –1985. –V. 24. – P. 861–867.
76. Fisher M. C. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security/ M. C. Fisher, N. J. Hawkins, D. Sanglard, S. J. Gurr // *Science.* - 2018. - V. 360. - Is. 6390. - P. 739-742.
77. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens/ K.M. Thambugala, D.A. Daranagama, A.J.L. Phillips [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* - 2020. – V. 10. – P. 604923.
78. Gašić S. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends / S. Gašić, B. Tanović // *Pesticides And Phytomedicine.* – 2013. – Vol. 28. – № 2. – P. 97-102.
79. Gaw A. Statins The HMG-CoA reductase inhibitors in perspective/ A. Gaw, C. J. Packard, J. Shepherd // *CRC Press.* – 2004. – 262p.
80. Ghribi D. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration / D. Ghribi, S. Ellouze-Chaabouni // *Biotechnology Research International.* – 2011. – Vol. 2011. – 6 p.
81. Growth inhibition and stability of Gap from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products/ J. Delgado, R. Acosta, A. Rodríguez-Martín [et al.] // *Int. J. Food Microbiol.*- 2015.- 205.- P. 23–29.- URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.029>.
82. Hahn M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study/ M. Hahn // *J. Chem. Biol.* - 2014. - V. 7. - Is. 4. - P. 133–141.

83. Have biopesticides come of age / T. Glare, J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson [et al.]// Trends in Biotechnology. – 2012. – Vol. 30. – № 5. – P. 250-258.
84. Hernández C.A. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus* / C.A. Hernández, N. Sandoval, J. Mallerman [et al.]// Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – № 18. – P. 327–332.
85. Hoagland R. E. Bioherbicides: Research and risks/ R. E. Hoagland, C. D. Boyette, M. A. Weaver, H. K. Abbas // Toxin Rev.- 2007.- Vol. 26.- P. 313-342.
86. Inhibition of the growth and development of potato early blight pathogen (*Alternaria solani*) by combining *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D with some Strobilurin-, Triazole-, and Phenylpyrrole-based fungicides/ A. Hatem, N. Karpova, V. Yaderet [et al.] // Agriculture.- 2022.- 12.-P. 1488 (дата обращения: 12 September 2022). doi: 10.3390/agriculture12091488.
87. Inhibition of the growth and development of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by combining azoxystrobin, *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876d, and *Bacillus* strains/ V.V. Yaderets, N.V. Karpova, E.V. Glagoleva [et al.]// Agronomy.- 2021.- 11.- P. 2520.
88. Inhibition of the Growth of *Botrytis cinerea* by *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D Combined with Fludioxonil-, Difenoconazole-, or Tebuconazole-Based Fungicides/ A. Hatem, V. Yaderets, N. Karpova [et al.] // Agronomy. – 2023. 13, 2602. – DOI. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102602/>.
89. Inouye M. Intramolecular chaperone: the role of the propeptide in protein folding/ M. Inouye // Enzymes. – 1991. –V. 45. – P. 314–321.
90. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*/ G. D. Lee, S. Y. Shin, C. Y. Maeng [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1999. – V. 263. – P. 646–651.
91. Jalving R. Characterization of the kexin-like maturase of *Aspergillus niger* / R. Jalving, P. J. van. de. Vondervoort, J. Visser, P. J. Schaap // Appl Environ Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 363–368.

92. Khater H.F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management / H.F. Khater // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2012. – Vol. 02. – № 05. – P. 244-259.
93. Kim M.H. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5 / M.H. Kim, Y.J. Kong, H. Baek, H.H. Hyun // Journal of Biotechnology. – 2006. – № 121. – P. 54-61.
94. Lamy B. Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: the leader sequence protects producing strains from suicide/ B. Lamy, J. Davies // Nucleic Acids Res. –1991. –V. 19. – P. 1001–1006.
95. Lamy B. The *Aspergillus* ribonucleolytic toxins (ribotoxins)/ B. Lamy, J. Davies, D. Schindler // Targeted Diagn. – 1992. –V. 7. – P. 237–258.
96. Leader B. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification/ B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan // Nat Rev Drug Discov.- 2008.- Vol. 7.- P. 21-39.
97. Lee, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* / S.Y. Lee // Trends Biotechnol. – 1996. – V. 14. – № 1. – P. 98-105.
98. Liu S. Bioprocess Engineering: book/ S. Liu.- Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design , 1st edition. – Elsevier, 2013.- 1000p.
99. Lucas J. A. The Evolution of Fungicide Resistance/ J. A. Lucas, N. J. Hawkins, B. A. Fraaije //Advances in Applied Microbiology. - 2015. - V. 90. - P.: 29-92.
100. Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi / H. G. Ma, Q. Liu, G. L. Zhu [et al.] //J Asian Natural Products Research. – 2016. - V. 18. - P. 92–115.
101. Mc Creary C. M. Fungicide efficacy of dry bean white mold [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] and economic analysis at moderate to high disease pressure/ C. M. Mc Creary, D. Depuydt, R.J. Vyn, C. L. Gillard // Crop Protection.- 2016. -V. 82.- P. 75-81.

102. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases/ M. Ghorbanpour, M. Omidvari, P. Abbaszadeh-Dahaji [et al.] // *Biological Control*. – 2018. - V. 117. - P. 147-157.
103. Mehnaz S. *Azospirillum*: A biofertilizer for every crop: Chap. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*/ S. Mehnaz // Springer.-New Delhi.- 2015.- P. 297-314.
104. Meyer V. New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*/ V. Meyer, U. Stahl // *Curr Genet*. – 2002. – V. 42. –P. 36–42.
105. Mia M. B. *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production/ M. B. Mia, Z. H. Shamsuddin // *African Journal of Biotechnology*.- 2010.- Vol. 9.- 6001-6009.
106. Microbes in pharmaceutical industry/ D. Kapoor, P. Sharma, M. M. Sharma [et al.] // *Microbial Diversity, Interventions and Scope: book* .- 2020.- P. 259-299.
107. Mishra U. Cyanobacteria: A potential biofertilizer for rice/ U. Mishra, S. Pabbi // *Resonance*.- 2004.- Vol. 9.- P. 6-10.
108. Mogannam S. A. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design / S. A. Moghannem, M.Frag, A. M. Shehab, M. S. Azab // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2018. –V. 49. – P. 452-462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>.
109. Nguyen P. A. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol/ P. A. Nguyen, C. Strub, A. Fontana, S. Schorr-Galindo. // *Biol. Control*.- 2017.- V. 104.- P. 10-27.
110. Nicoletti R. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin/ R. Nicoletti, A. Trincone// *Marine Drugs*.- 2016.- 14.-P. 37.
111. Novel Ergot Alkaloids Production from *Penicillium citrinum* Employing Response Surface Methodology Technique/ M. G. Shahid, M. Nadeem, A. Gulzar [et al.] // *Toxins (Basel)*.- 2020 Jun 29.- 12(7).- 427.- doi: 10.3390/toxins12070427.- PMID: 32610508; PMCID: PMC7405006.

112. Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology / H. Yue, J. Zhong, Z. Li, J. Zhou [и др.] // 136 Biotechnology. – 2021. – № 11. – P. 36.
113. Park Y. Asian Americans: Japanese/ Y. Park // In Terry Mizrahi & Larry E. Davis (Eds.), The Encyclopedia Of Social Work: book .- New York: Oxford University Press.- 2008 .- pp.167-168.
114. Pérez-García A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agricultureю/ A. Pérez-García, D. Romero , A. Vicente // Current Opinion in Biotechnology.- 2011. - V. 22. - Is. 2. - P. 187-193.
115. Physiologically active substances and fermentative process for the same/ A. Endo, M. Kuroda, A. Terahara [et al.] // United States Patent.- 1977.- p. 4,049,495.
116. Richer D.L. Synergism: a patent view/ D.L. Richer // Pesticide Science.- 1987.- 19.- P. 309–315.- doi.org/10.1002/ps.2780190408.
117. Roger G. H. Bioseparations science and engineering: book/ G. H. Roger, W. T. Paul, R. R. Scott, P. Demetri.- Petrides.– 2nd edition. – NY.: Oxford University Press.- 2015.
118. Romanenko N.D. Study of spreading Potato Cyst Nematode – *Globodera rostohiensis* and evaluation of Lovastatin and Compactin nematicide activity/ N.D. Romanenko, I.O. Popov, M.V. Pridannikov, V.G. Dzhavakhia // Theory and Practice of Plant Parasitic Pathogens: Conference.- Moscow, 2002. – P.251-257.
119. Schmeisser C. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes/ C. Schmeisser, H. Steele , W. R. Streit // Applied microbiology and biotechnology.- 2007.- 75.- P. 955-62.
120. Schmitt M. J. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application/ M. J. Schmitt, F. Breinig // FEMS Microbiol Lett. – 2002. –V. 26. –P. 257–276.
121. Seidah N. G. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins / N. G. Seidah, M. Chretien // Curr Opin Microbiol. – 1997. – V. 8. – P. 602–607.
122. Sharma K.R. Continuous Process Dynamics, Stability, Control & Automation: book/ K.R. Sharma.- Nova Science Publishers, Inc.- 2015.- 598p.



123. Shcherbakova L.A. Fungicide resistance of plant pathogenic fungi and their chemosensitization as a tool to increase anti-disease effects of triazoles and strobilurines (review)/ L.A. Shcherbakova // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. - 2019. - V. 54. - № 5. - P. 875-891.

124. Sonawane S.H. Chemical And Bioprocess Engineering Trends and Development: book// S.H. Sonawane, Y.P. Setty, S.N. Sapavatu.- RC Press Taylor & Francis Group.- 2015.- 452p.

125. Studying the Ability of Thymol to Improve Fungicidal Effects of Tebuconazole and Difenoconazole Against Some Plant Pathogenic Fungi in Seed or Foliar Treatments/ L. Shcherbakova, O. Mikityuk, L. Arslanova [et al.] // Frontiers in Microbiology. - 2021. - V.12. – P. 629429.

126. Studying the Ability of Thymol to Improve Fungicidal Effects of Tebuconazole and Difenoconazole Against Some Plant Pathogenic Fungi in Seed or Foliar Treatments/ L. Shcherbakova, O. Mikityuk, L. Arslanova [et al.] //Frontiers in Microbiology.- 2021.- V.12.

127. Syed M. B. Fermentative production and optimization of mevastatin in submerged fermentation using *Aspergillus terreus*/ M. B. Syed, M. Rajasimman // Biotechnology Reports.- 2015.- V. 6.- P. 126-128.- doi. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.002>.

128. Takahashi S. Function of the prosequence for in vivo folding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*/ S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka // Appl Microbiol Biotechnol. – 2001. –V. 55. – P. 454–462.

129. The biosynthesis of a cytotoxic protein, alpha-sarcin, in a mold of *Aspergillus giganteus*. II. Maturation of precursor form of alpha-sarcin in vivo/ Y. Endo, T. Oka, S. Yokota [et al.] // Tokushima J Exp Med. –1993. –V. 40. – P. 7–12.

130. The evolutionary conserved  $\gamma$ -core motif in fluences the anti-Candida activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF/ C. Sonderegger, G. Váradi, L. Galgóczy [et al.] // Front. Microbiol.-2018.- 9.- P. 1655.- URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01655>.

131. The role of the *Aspergillus niger* furin-type protease gene in processing of fungal proproteins and fusion proteins. Evidence for alternative processing of recombinant (fusion-)proteins/ P. J. Punt, A. Drint-Kuijvenhoven, B. C. Lokman [et al.] // J Biotechnol. – 2003. – V. 106. – P. 23–32.

132. The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum*—A mechanism of action oriented review / N. Hegedűs, E. Leiter, B. Kovács [et al.] // J. Basic Microbiol.- 2011.- 51.- P. 561–571.

133. Tumbarski Y. Study on the influence of the cultural conditions and the composition of the culture medium on the antimicrobial activity of *Bacillus methylotrophicus* BM47 against some fungal phytopathogens / Y. Tumbarski, E. Petkov, Z. Denkova // Journal of Global Biosciences. – 2015. – V. 4. – №. 8. – P. 2990-2996.

134. Two small, cysteine-rich and cationic antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum*: A comparative study of PAF and PAFB/ A. Huber, L. Galgoczy, G. Varadi, J. Holzknecht [et al.] // BBA – Biomembranes. - 2020. - V. 1862. – P. 83246.

135. Ukraintseva S.N. Potentiality of compactin using as the protection frame of plants against pathogenic organisms/ S.N. Ukraintseva // Anniversary proceeding digest ‘Fifty years on guard of home food safty’, RAAS, ARRIP, B. Vyazyomy.- Russia, 2008.- P. 488–496.

136. Ustilago maydis KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins/ J. Tao, I. Ginsberg , N. Banerjee [et al.] // Mol Cell Biol. –1990. – V. 10. – P. 1373–1381.

137. Wnendt S. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal protein from *Aspergillus giganteus*/ S. Wnendt, N. Ulbrich, U. Stahl // Curr Genet. – 1994. – V. 25. –P. 519–523.

138. Xu J. Intron requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*/ J. Xu, Z. Z. Gong // Microbiology. – 2003. – V. 149. – P. 3093–3097.