

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИТОПАТОЛОГИИ**

На правах рукописи

Джавахия Вахтанг Витальевич

Изучение возможности применения ловастатина для защиты растений от болезней и разработка технологии производства статинов на основе использования новых штаммов-продуцентов.

Специальности: 06.01.11 – Защита растений
03.00.23 - Биотехнология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Большие Вяземы 2007

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной биологии Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Россельхозакадемии в 2004-2007 гг.

Научный руководитель: кандидат биологических наук Петелина Г.Г.

Официальные оппоненты:

Доктор технических наук,

Профессор

Нугманова Татьяна

Алексеевна

Доктор биологических наук,

Умнов Анатолий

Михайлович

Ведущая организация:

ГНУ Институт биохимии и физиологии

микроорганизмов им. Г. К. Скрябина

Российской академии наук

Защита состоится «26» октября 2007 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета К-006-064-01 во Всероссийском научно-исследовательском институте фитопатологии по адресу: 143050 Московская область, Одинцовский р-н, Большие Вяземы, ГНУ ВНИИФ.

Факс: 8(496) 334 11 24

E-mail: yaho@vniif.rosmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии.

Автореферат разослан – « 22 » сентября 2007 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

И.Н. Яковлева

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Защита растений от патогенов и вредителей является экономически значимой проблемой и важным направлением научных исследований. Преобладающими методами защиты растений до сих пор являются различные способы обработки посевов и семенного материала синтетическими пестицидами, созданными на основе химических соединений. Наряду с эффективностью защитного действия, синтетические пестициды имеют ряд недостатков.

Они являются ксенобиотками, которые загрязняют окружающую среду и сельскохозяйственную продукцию и могут представлять опасность для здоровья. Во многих случаях для достижения надежного защитного эффекта необходимо проводить многократную обработку растений и почвы пестицидами, что усиливает нежелательные последствия их применения. Использование веществ биологического происхождения, по-видимому, является более безопасным для окружающей среды методом защиты растений от патогенов и вредителей.

Другой недостаток защитных технологий, использующих синтетические пестициды, возникновение резистентных к ним форм патогенов и вредителей. Это снижает эффективность применения препаратов, вынуждает увеличивать дозы и количество обработок, что в конечном итоге приводит к потере экономической целесообразности применения пестицидов. Одним из возможных путей решения этой проблемы является поиск защитных средств «непрямого действия», то есть препаратов, не действующих непосредственно на патоген или вредитель, а воздействующих на определенные пути биосинтеза в растении-хозяине, частичное блокирование или изменение которых приводит к нарушениям питательной цепочки в системе растение-паразит. В качестве защитных препаратов «непрямого действия» могли бы быть использованы ингибиторы биосинтеза стероидов в растительных тканях (Тарлаковский, 1977; Метлицкий и др. 1980; Лутова и Ходжайова, 1998). Известно, что фитопаразитические нематоды и насекомые, а также оомицеты (сем. Phythiaceae) не способны синтезировать стероиды, необходимые для их развития

(Метлицкий и др., 1976; Щербакова Л.А. и др. 1980; Зиновьева и др. 1989). Эти организмы получают стеринны из растительных тканей, то есть, в этом смысле, они полностью зависят от стериннов, синтезируемых растениями-хозяевами. Вмешательство в биосинтез фитостериннов может приводить к нарушению жизненного цикла у данных патогенов и вредителей. Так, известно, что некоторые широко используемые в сельском хозяйстве фунгициды являются ингибиторами биосинтеза стериннов в грибах (Kato, 1986, Koller, 1987).

В течение последних десяти лет интенсивно изучаются вещества, относящиеся к новому поколению высокоспецифических ингибиторов биосинтеза стериннов – так называемых статинов, являющихся продуктами вторичного метаболизма у ряда грибов. Эти соединения являются лидерами продаж на мировом фармацевтическом рынке в категории препаратов снижающих уровень холестерина. Статины отличаются от вышеупомянутых фунгицидов чрезвычайно высокой специфичностью действия и способностью ингибировать фермент окси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу (ОМГ-КоА-редуктазу), функционирующий на ранних этапах биосинтеза стериннов (Serizawa, N. and T. Matsuoka, 1991). В этой связи представляется актуальным изучение действия статинов на фитопатогенные грибы, а также, на их растения-хозяева.

В Лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ в течение многих лет проводятся исследования грибов из рода *Aspergillus* и *Penicillium*, которые синтезируют структурно сходные ингибиторы биосинтеза стериннов, относящиеся к группе статинов. Ловастатин и Компактин, образуемые этими грибами, являются типичными представителями данной группы. Выбор этих статинов в качестве объектов исследований для изучения возможности их применения в сельском хозяйстве, помимо способности данных веществ специфически ингибировать синтез стериннов, обусловлен также отсутствием у этих соединений антибиотической активности и выраженной токсичности по отношению к теплокровным.

К началу наших исследований, старшим научным сотрудником Лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ Т.М. Воиновой были получены стабильные

мутанты грибов *A. terreus* и *P. citrinum* – способные продуцировать, соответственно, ловастатин и компактин в количествах, в сотни раз превышающих исходную продуктивность коллекционных штаммов. Полученные высокопродуктивные штаммы *A. terreus* и *P. citrinum* значительно отличались от исходных коллекционных штаммов по морфолого-культуральным свойствам и потребностям в компонентах питательной среды. Продуктивность этих мутантов при выращивании в качалочных колбах оказалась достаточной для их использования в промышленных целях, однако было необходимо разработать технологии производства ловастатина и компактина в ферментационных установках.

Актуальной являлась также разработка простой и сравнительно дешевой схемы выделения и очистки целевого продукта ловастатина из получаемой при ферментации культуральной жидкости, поскольку опубликованные в научной литературе или запатентованные методы выделения и очистки статинов, рассчитанные на получение высокоочищенных медицинских препаратов, отличаются сложностью и дороговизной. Сравнительно простая и дешевая схема получения ловастатина могла бы найти применение при создании препаратов для защиты растений, поскольку в сельском хозяйстве могут быть использованы вещества с менее высокой степенью очистки, чем в фармакологии.

Цели и задачи. Основной целью исследований было изучение возможного защитного действия ловастатина против фитопатогенов. Кроме того, была поставлена цель разработать оптимальную технологическую схему ферментации для вновь полученных мутантных штаммов-продуцентов ловастатина и компактина и разработать простую и сравнительно дешевую технологическую схему выделения и очистки ловастатина.

Задачи исследований:

1. Изучение фунгитоксичности ловастатина по отношению к фитопатогенным грибам.
2. Изучение защитного действия ловастатина против возбудителей септориоза и стеблевой ржавчины пшеницы.

3. Изучение влияния ловастатина на болезни, вызываемые фитовирусами.
4. Оценка влияния ловастатина на рост и развитие растений.
5. Поиск оптимальных концентраций компонентов питательной среды для достижения максимальной продуктивности штаммов грибов – продуцентов ловастатина и компактина.
6. Подбор оптимальных параметров аэрации способствующих максимальной продуктивности этих штаммов.
7. Разработка простой и дешевой технологической схемы получения целевого продукта для использования в качестве средства защиты растений.

Новизна научной работы. Впервые показаны фунгицидные свойства ловастатина против грибов *Stagonospora nodorum*, *Magnaporthe grisea* и *Colletotrichum atramentarium*. Впервые показана способность ловастатина блокировать биосинтез грибного меланина на его ранних этапах. Впервые показана антивирусная активность ловастатина.

Подобраны оптимальные параметры ферментации для глубинного культивирования в ферментерах вновь полученных высокопродуктивных штаммов грибов *A. terreus* и *P. citrinum*.

Разработана простая и сравнительно дешевая технологическая схема выделения и очистки ловастатина. Эти данные были включены в патент (Джавахия и др., 2005).

Практическое значение. Полученные данные по защитному действию ловастатина против патогенов растений и вредителей были подтверждены в исследовательском отделе итальянской фирмы ISARGO (Милан, Италия). Подписан договор о конфиденциальности и совместных испытаниях, планируется патентование пестицидной активности ловастатина и технологии производства ловастатина для использования его в качестве средства защиты растений от патогенов и вредителей.

На основе данных по оптимизации процессов ферментации, выделения и очистки ловастатина был разработан лабораторно-технологический регламент производства ловастатина, на базе которого совместно с сотрудниками

Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН и фирмы ООО «БИОБЭК» был разработан полупромышленный регламент на производство ловастатина. Налажено производство пробных партий ловастатина на производственной базе ООО «БИОБЭК» - Ефремовском заводе биопрепаратов (получена справка о внедрении). Разработанная технология выделения ловастатина запатентована (совместный патент с ООО «БИОБЭК»). Разработанные технологии ферментации, выделения и очистки ловастатина, прошли успешные пилотные испытания и масштабируются на фармацевтическом предприятии ОАО «Красфарма» (получена справка о внедрении).

Апробация работы. Материалы работы докладывались и обсуждались на 26-й конференции по передовым биотехнологиям в России (Япония, Токио, 19 сентября 2003 года, доклад); на первой и второй Международной конференции «НАУКА – БИЗНЕС - ОБРАЗОВАНИЕ, Биотехнология - Биомедицина - Окружающая среда» (Пушино, 10-13 мая 2005 года, доклад). На во II Московском международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития”; На в III Московском международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития”

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследований и их обсуждение, выводы, список публикаций по теме диссертации и список использованной литературы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Штаммы фитопатогенных грибов *Stagonospora nodorum* - возбудителя септориоза пшеницы, *Puccinia graminis* – возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы, *Colletotrichum atramentarium* - возбудителя антракноза томатов, *Magnaporthe grisea* - возбудителя пирикулярноза риса, были получены из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ.

Препарат вируса табачной мозаики использовался для заражения в виде сока растений табака инфицированных ВТМ.

Диагностические наборы для определения содержания вирусных антигенов S, X, Y, A, L и M-вирусов в образцах тканей картофеля были приобретены во ВНИИ картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха.

В качестве продуцента ловастатина в работе использовали мутантный штамм гриба *Aspergillus terreus* с индексом 45-50, полученный ранее из штамма *A. terreus* ATCC 20542, который был приобретен в коллекции ATCC (American Type Culture Collection).

В качестве продуцента компактина использовался мутантный штамм *Penicillium citrinum* с индексом 18-12, который был получен из исходного штамма *P. citrinum* SANK 18767, любезно предоставленного доктором Т. Корпела из Университета г. Турку (Финляндия). Оба мутанта 45-50 и 18-12 были получены методом многоступенчатого индуцированного мутагенеза сотрудником Лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ Т.М. Воиновой.

Лактонная форма ловастатина была приготовлена в Лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ.

2.1. Методы изучения фунгитоксичности ловастатина.

Для культивирования грибов *St. nodorum* и *C. atramentarium* использовали агаризованную среду Чапека-Докса с добавлением 1 г/л дрожжевого экстракта (Dhingra and Sinclair, 1986). Для культивирования гриба *M. grisea* использовали морковную агаризованную среду (Dhingra and Sinclair, 1986). Водный раствор натриевой соли ловастатина добавляли в стерильные агаризованные питательные среды в различных концентрациях и культивировали *M. grisea* при температуре 28 °С, а *St. nodorum* и *C. atramentarium* - при 24 °С.

Диаметр выросших колоний измеряли на 7-ой и 12-й дни роста. Опыт проводили дважды в трехкратной повторности. Степень ингибирования роста колоний определяли как отношение диаметра колоний грибов, выращенных на средах с добавлением различных концентраций статина, к диаметру контрольных колоний.

Для изучения антивирусной активности ловастатина растения табака выращивали в климатической камере при дневной температуре 22 °С и 16-ти часовом периоде освещенности. Ночная температура составляла 20 °С. В опыте

использовали отделенные листья табака. Растения табака (*N. Tabacum*) сорта *Xanthi* (NN) выращивали в горшках с почвой до стадии 5-6 настоящих листьев. Для каждого варианта опытов отбирали по 5 листьев с разных растений. Левую половину листа обрабатывали 10 мкл раствора ловастатина в разных концентрациях и 10 мкл суспензии ВТМ. Контрольную правую половину листа обрабатывали 10 мкл воды и 10 мкл суспензии ВТМ. Обработанные листья помещали во влажную камеру при 22°C. Количество некрозов, образовавшихся в ответ на инокуляцию ВТМ, подсчитывали отдельно для каждой половины листа через три - четыре дня после инокуляции. Опыты проводили трижды в пятикратной повторности.

Для определения антивирусной активности ловастатина на растениях картофеля в полевых условиях обработанные раствором ловастатина клубни картофеля сорта Сантэ были высажены на делянках. Перед посадкой клубни замачивали в 0,1% и 0,3%-ном растворах ловастатина в течение 60 минут (по 20 клубней на каждый вариант обработки). Через неделю после всходов растения опрыскивали 0,1% раствором ловастатина. Первый учет проводили через 3 недели а второй через 5 недель после появления всходов. Анализ проб на содержание вирусных антигенов проводился методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2.2. Методы определения защитных свойств ловастатина против септориоза и ржавчины пшеницы.

Проростки пшеницы выращивали в климатической камере. Дневное время при выращивании составляло 16 часов, температура днем была 22 °С, а ночью 20 °С. Отрезки первых полностью развернувшихся листьев длиной 4 см помещали на агар с бензимидазолом (40 мг/л) по 10 штук. На верхние части отрезков листьев наносили по 10 мкл раствора ловастатина со спорами грибов. Суспензию спор гриба в воде также в объеме 10 мкл, содержащую такое же количество спор, наносили на нижнюю часть отрезков листьев.

Чашки с листьями пшеницы выдерживали в течении суток в темноте, а затем помещали в световую камеру при комнатной температуре на 6 суток. Степень развития септориоза определяли по 5-балльной шкале (Пыжикова и др.,

1989). Для оценки степени развития стеблевой ржавчины сравнивали среднее количество уредопустул в опыте и контроле. Эксперимент был проведен по методике Пыжиковой (Пыжикова и др., 1989).

2.3. Метод определения влияния ловастатина на развитие проростков пшеницы.

Семена пшеницы сорта Мироновская 808 замачивали в растворе ловастатина на 1,5-2 часа, далее помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную раствором ловастатина в соответствующей концентрации. После появления ростков, зерна помещали в горшки с грунтом. Горшки помещали в климатическую камеру. Период освещенности составил 16 часов, температуры дневная была 22 °С, а ночная 20 °С. Длину проростков измеряли в фазе 2-ух листьев.

2.4. Методы проведения ферментаций штаммов-продуцентов статинов.

Эксперименты проводились на ферментационной установке состоящей из стойки четырех ферментеров и блока автоматического управления процессом при помощи компьютера. Концентрация растворенного кислорода (pO_2), уровень pH, температура и интенсивность перемешивания культуральной жидкости измерялись и контролировались автоматически. Во всех экспериментах была использована исходная питательная среда следующего состава: для ловастатина (г/л): глюкоза - 100, соевая мука - 20, пептон - 5, солодовый экстракт - 2.5, NaCl - 2, KH_2PO_4 - 0.5, $MgSO_4$ - 0.5. Для компактина (г/л): сахароза-100, соевая мука-20, пептон-10, дрожжевой экстракт- 3, $NaNO_3$ -5, $MgSO_4$ -1.

Культура засеивали в Чашки Петри и помещалась в термостаты на 210-240 часов при температуре 26 °С для гриба *A. terreus* и на 240-280 часов при температуре 24 °С для гриба *P citrinum*. Выросшим мицелием грибов засеивали качалочные колбы для получения посевного материала в термостатируемых качалочных установках. Культивирование в колбах происходило в течении 72 часов. Готовая вегетативная культура переносилась в ферментеры. Культивирование штаммов-продуцентов в лабораторных ферментерах продолжалось в среднем 220-240 часов.

Анализ проб производился при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Отобранные в аппаратах пробы, экстрагировали этилацетатом и анализировали на хроматографе фирмы “Gilson”, используя ультрафиолетовый детектор (237 нм), скорость потока 1 мл/мин, мобильная фаза ацетонитрил : уксусная кислота .

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Изучение влияния ловастатина на фитопатогены *in vitro*.

3.1.1. Изучение фунгитоксичности ловастатина и его способности подавлять биосинтез меланина у фитопатогенов *Stagonospora nodorum*, *Magnaporthe grisea* и *Colletotrichum atramentarium*.

Водный раствор ловастатина в различных концентрациях добавляли в агаризованную питательную среду. Затем на поверхность сред в центр наносили кусочки грибного мицелия и измеряли диаметр развившихся колоний. Ингибирующий эффект ловастатина на линейный рост колоний был в разной степени отмечен для всех исследуемых грибов (Таблица 1).

Таблица 1. Изменение диаметра колоний грибов в зависимости от концентрации добавленного в питательную среду ловастатина.

Гриб	Дни	Концентрация натриевой соли ловастатина, %							
		0	0,0002 5	0,001	0,005	0,01	0,02	0,04	0,1
<i>Stagnospora nodorum</i>	7	100%	92,3%	91,7 %	70,9 %	65,1 %	45,3 %	27,0 %	7,3%
	12	100%	96,4%	97,7 %	84,1 %	73,3 %	58,7 %	34,5 %	6,8%
<i>Magnaporthe grisea</i>	7	100%	88,9%	68,0 %	40,3 %	22,5 %	0	0	0
	12	100%	97,2%	60,0 %	34,7 %	31,5 %	16,7 %	0	0

<i>Colletotrichum</i>	7	100%	78,0%	65,8	48,1	38,5	23,5	11,5	0
<i>atramentarium</i>	12	100%	95,6%	74,8	68,9	41,1	34,8	22,9	0

Во всех экспериментах по оценке фитотоксичности ловастатина *in vitro* было отмечено также обесцвечивание мицелия всех исследуемых грибов. На рисунке 1 показан феномен обесцвечивания мицелия на примере гриба *St. nodorum*.

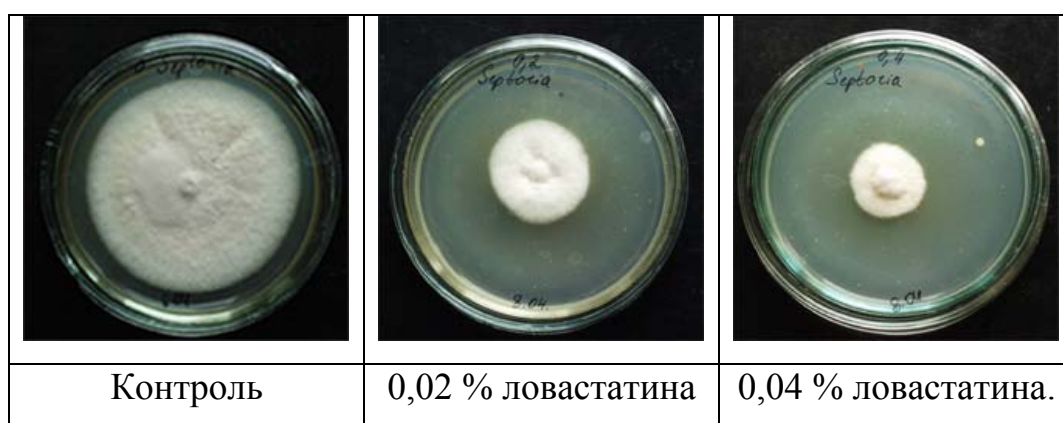


Рисунок 1. Рост колоний гриба *St. nodorum* на среде, содержащей ловастатин.

Известно, что блокирование поликетидного пути биосинтеза меланина у ряда фитопатогенных грибов приводит к потере их патогенности (Henson etc, Butter etc, 2001). Поэтому можно предположить, что ловастатин, помимо контактного фунгицидного действия, может оказывать защитное действие также путем подавления патогенности гриба, в том числе блокируя меланиногенез.

3.1.2. Влияние ловастатина на развитие септориоза и ржавчины пшеницы.

Для оценки влияния ловастатина на развитие септориоза и стеблевой ржавчины пшеницы были проведены опыты на изолированных листьях пшеницы сорта Мироновская 808.

Таблица 2. Влияние ловастатина на развитие септориоза на листьях пшеницы.

Гриб	Срок после инфицирования, сутки	Концентрация ловастатина	Средний балл поражения	Защитный эффект, % от контроля
<i>Stagonospora nodorum</i>	7	0	3,6	-
		0,05	-	-
		0,005	0,2	94
		0,0005	0,2	94
	12	0	3,8	
		0,05	-	-
		0,005	-	-
		0,0005	1	72

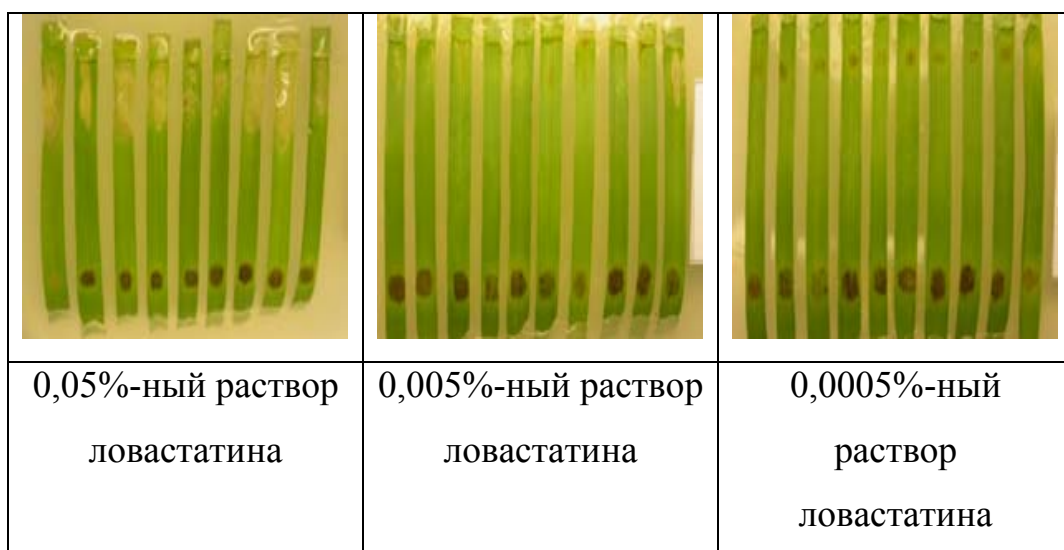


Рисунок 2. Защитный эффект ловастатина против септориоза пшеницы.

Результаты опытов свидетельствовали о способности ловастатина подавлять развитие септориоза на листьях пшеницы. Аналогичный эффект был обнаружен и в опытах с возбудителем стеблевой ржавчины на пшенице. Обработка листьев пшеницы ловастатином, вызывала существенный защитный эффект уже при его концентрации 0,0005%. Поскольку было показано, что прямое фунгитоксичное действие ловастатина проявляется при концентрациях выше

0,01%, высокий защитный эффект низких концентраций ловастатина, по-видимому, должен быть обусловлен иным механизмом действия этого статина в системе *St. nodorum* – пшеница. Например, снижение патогенности данного гриба вследствие подавления биосинтеза меланина.

3.1.3. Влияние ловастатина на заражение табака вирусом табачной мозаики.

Половинки листьев табака обрабатывались раствором ловастатина, затем эти листья инокулировали суспензией ВТМ.

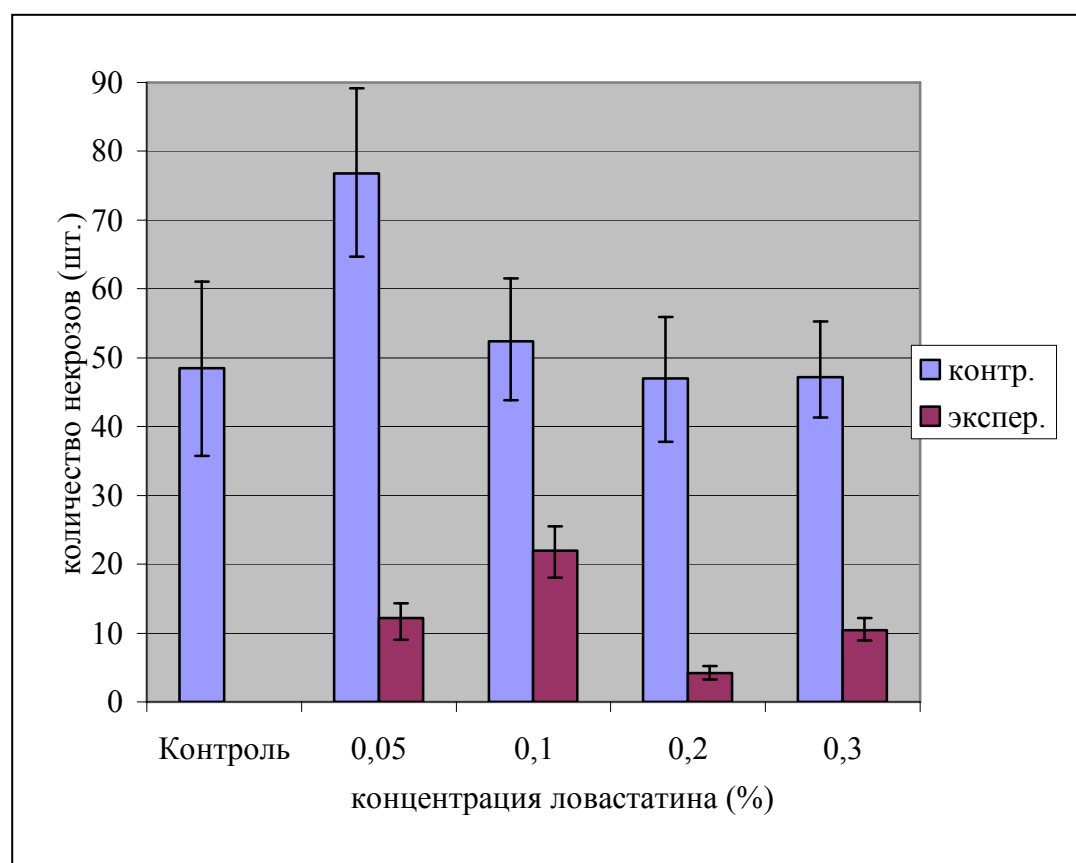


Рисунок 3. Влияние обработок листьев табака раствором ловастатина на заражение растений вирусом табачной мозаики.

Обработка листьев раствором ловастатина перед заражением их ВТМ, приводило к ослаблению вирусной инфекции. Количество некрозов на обработанных половинках листьев было меньше, чем на необработанных половинках (рис.3).

3.1.4. Влияние ловастатина на устойчивость к вирусам картофеля в полевых экспериментах.

Клубни картофеля замачивали в растворах ловастатина перед посадкой. Вторая обработка путем опрыскивания ботвы картофеля была произведена в поле через неделю после всходов. Эксперимент проводили на естественном инфекционном фоне. В год проведения исследования в контрольных образцах картофеля были обнаружены только антигены М-вируса (МВК) картофеля. Количества антигенов S -, X - и Y - вирусов картофеля были незначительны, а антигены А - и L -вирусов не были обнаружены.

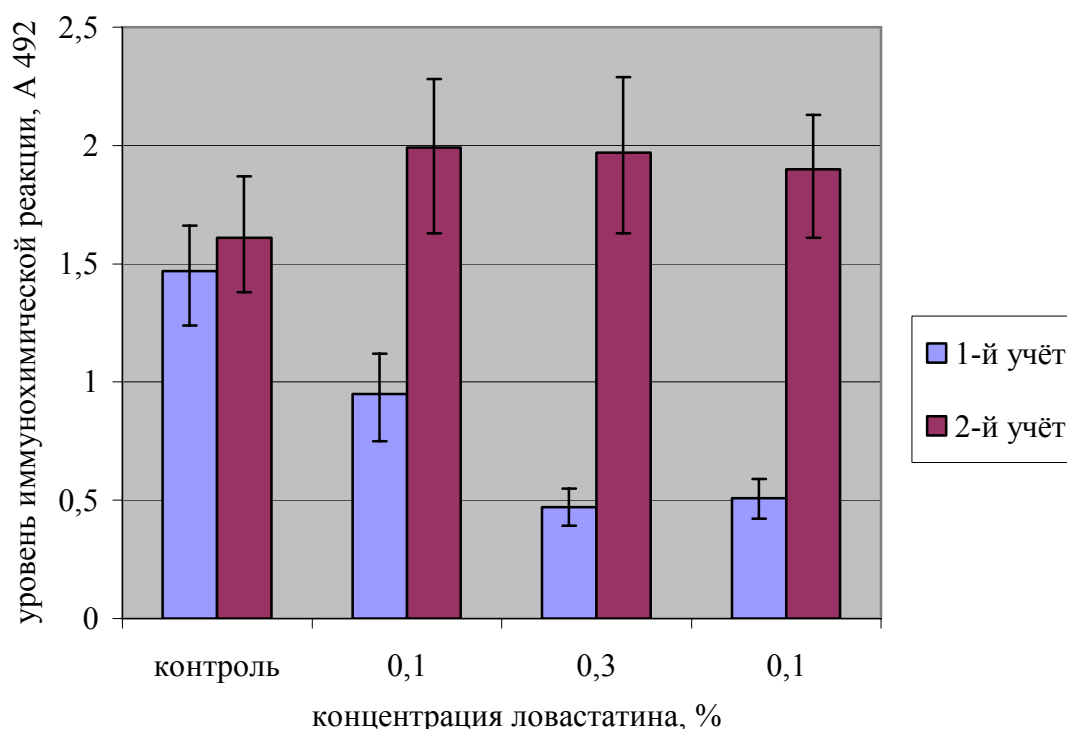


Рисунок 4. Влияние ловастатина на устойчивость картофеля к МВК в полевых экспериментах.

В связи с этим оказалось возможным проверить антивирусное действие ловастатина только в отношении МВК. ИФА сока обработанных растений картофеля показал, что предпосадочная обработка клубней и однократная обработка вегетирующих растений приводили к снижению содержания вирусного антигена в тканях растений в течение трех недель после посадки (рис.4). Однако, через пять недель количество вирусного антигена в тканях

обработанных растений уравнивалось с количеством антигена в контрольных необработанных растениях.

3.1.5. Влияние ловастатина на рост и развитие проростков пшеницы.

Для определения влияния ловастатина на рост растений, зерна пшеницы были замочены в растворах с разной концентрацией ловастатина. Обработка семян ловастатином приводила к некоторой задержке роста у проростков пшеницы.

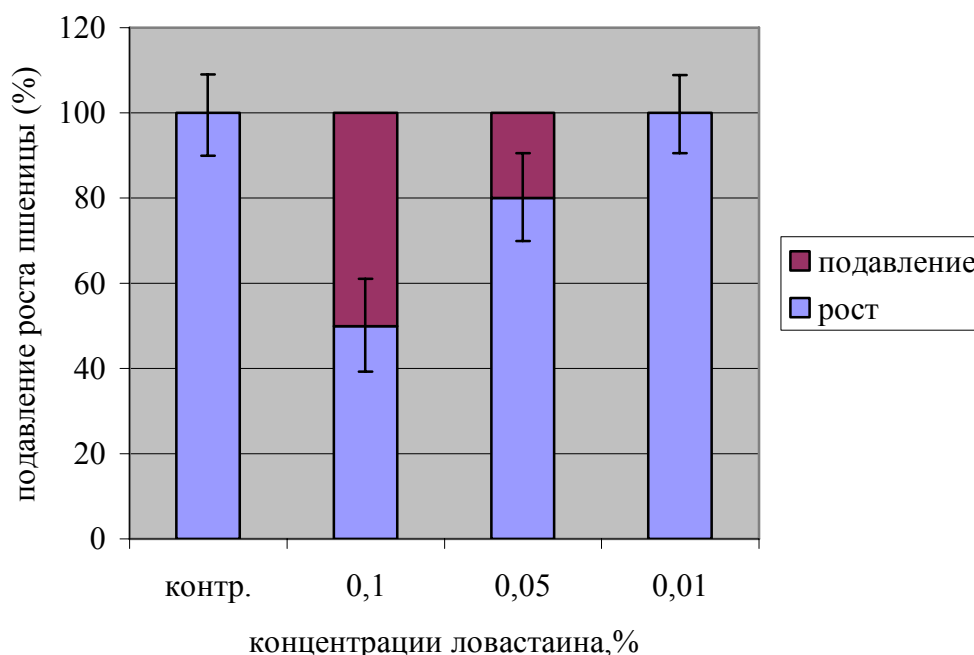


Рисунок 5. Подавление роста проростков пшеницы при обработке семян ловастатином.

Было установлено, что ловастатин в концентрации 0,1 % подавляет рост проростков в среднем на 50%, но при концентрации ловастатина 0,01% рост-ингибирующий эффект уже не наблюдался (рис.5). Ранее было обнаружено (Таблица 2), что уже 0,0005%-ный раствор ловастатина обладал защитным эффектом против грибных патогенов, а его ретардантное действие проявлялось при более высоких концентрациях. Таким образом, применение ловастатина на пшенице в «защитных» дозах, вероятно, не должно оказывать негативного влияния на ее рост и развитие.

3.2. Подбор оптимальных параметров для ферментации гриба *A. terreus* - продуцента ловастатина.

3.2.1. Влияние количества растворенного кислорода (pO_2) на биосинтез ловастатина.

При выращивании аэробных микромицетов, лимитирующим фактором биосинтеза целевых продуктов зачастую, является содержание растворенного кислорода в среде. В связи с этим была исследована зависимость накопления ловастатина от насыщения культуральной жидкости растворенным кислородом.

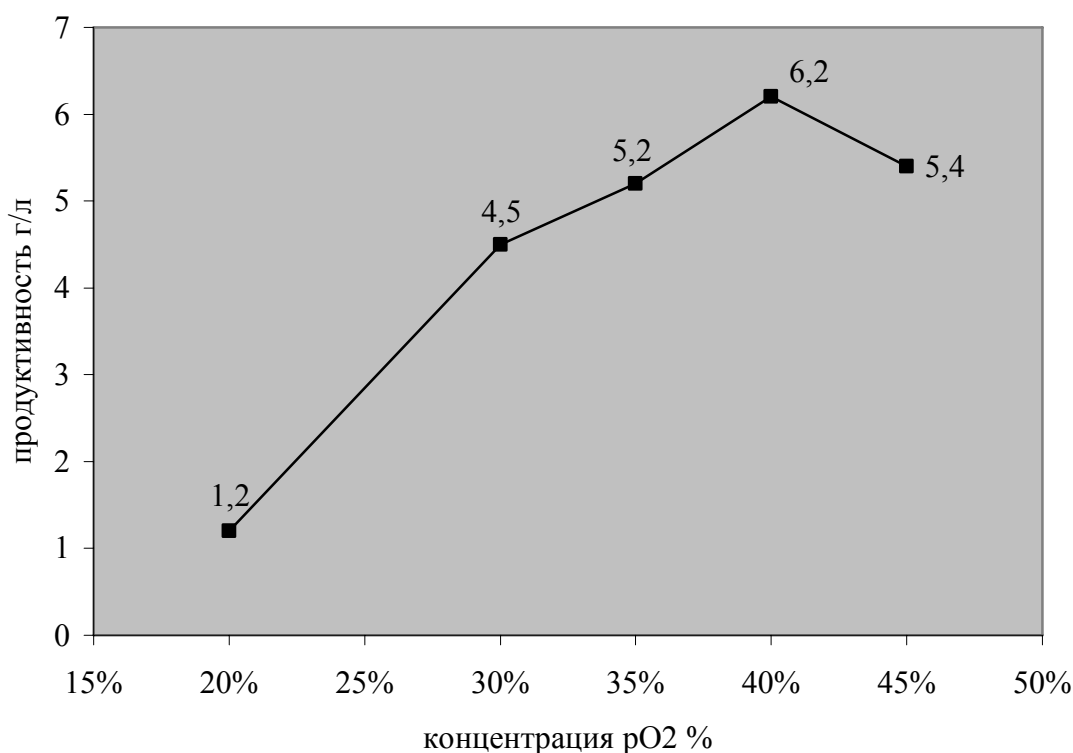


Рисунок 6. Влияние концентрации растворенного кислорода (pO_2) на биосинтез ловастатина.

Согласно представленным результатам (рис.6), максимальная концентрация ловастатина в культуральной жидкости была достигнута при поддержании кислорода на уровне 40% и составила 6,2 г/л. Дальнейшее увеличение концентраций кислорода не приводило к увеличению выхода целевого

продукта. Поддержание pO_2 на уровне 20 % практически ингибировало биосинтез ловастатина в культуральной жидкости.

3.2.2. Влияние концентрации соевой муки в питательной среде на биосинтез ловастатина.

Соевая мука является богатым источником белка для культивируемых грибов. Целью данного опыта было определение оптимального количества соевой муки, соответствующее максимальному выходу целевого продукта.

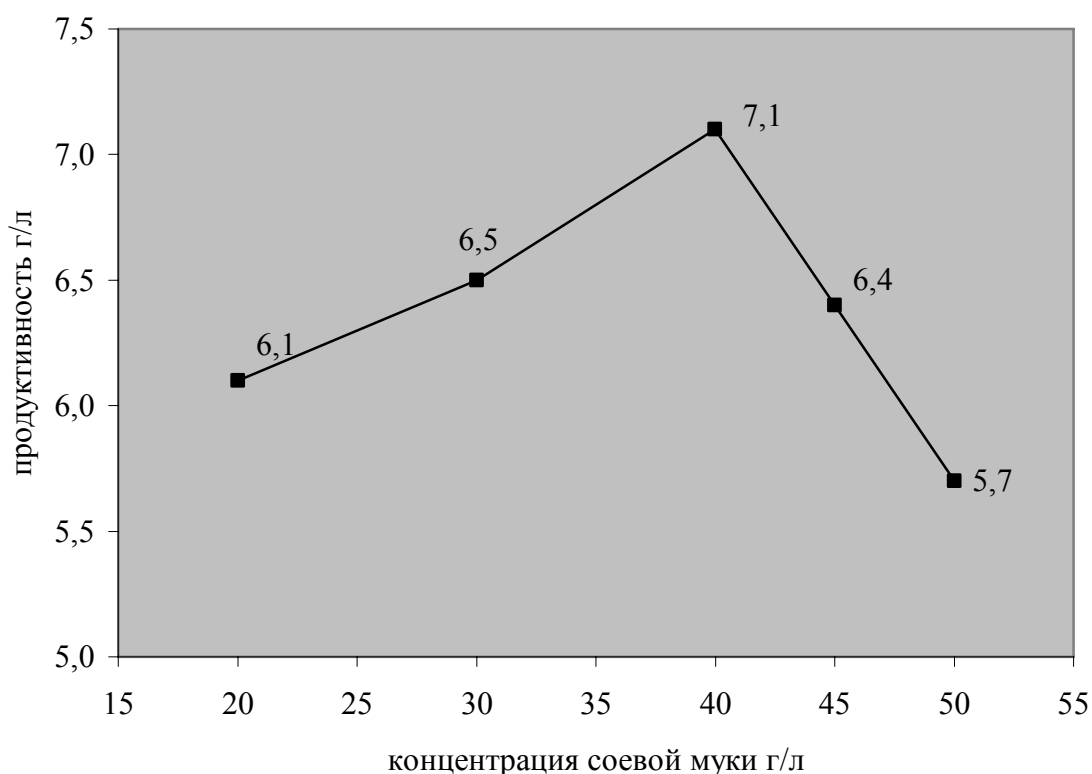


Рисунок 7. Влияние концентрации соевой муки в питательной среде на биосинтез ловастатина.

Согласно полученным результатам, оптимальная концентрация соевой муки в питательной среде составила 40 г/л, продуктивность при этом составила 7,1 г/л ловастатина (рис.7). Дальнейшее увеличение концентрации соевой муки в питательной среде снижало продуктивность, что могло быть обусловлено накоплением излишней биомассы на единицу объема культуральной жидкости и снижением массопередачи кислорода, что приводило к снижению концентрации pO_2 .

3.2.3. Влияние концентрации глюкозы на биосинтез ловастатина.

В качестве источника углеводов для биосинтеза ловастатина используется глюкоза. Был проведен ряд экспериментов целью, которых являлось определить оптимальную концентрацию глюкозы, способствующей максимальной продуктивности штамма.

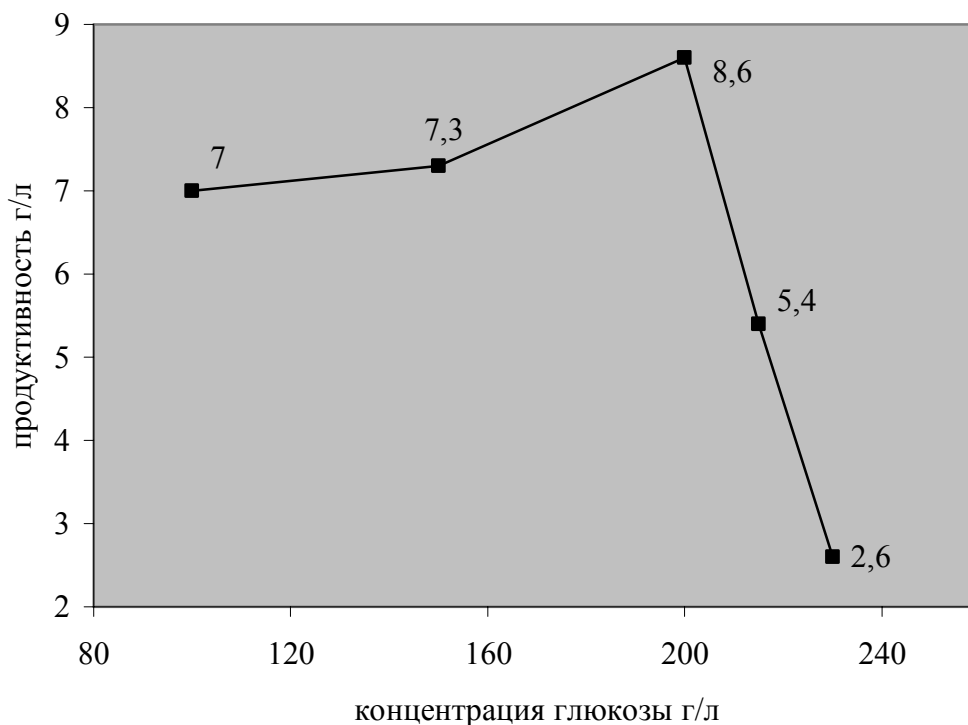


Рисунок 8. Влияние концентрации глюкозы в питательной среде на биосинтез ловастатина.

Согласно полученным результатам, оптимальная концентрация глюкозы для биосинтеза ловастатина составила 200 г/л, концентрация ловастатина в культуральной жидкости при этом достигла 8,6 г/л (рис.8). Превышение оптимальной концентрации глюкозы ингибировало биосинтез ловастатина, что коррелировало с проведенными ранее исследованиями в качалочных колбах.

3.2.4. Подбор оптимальных концентраций пептона в питательной среде.

Пептон является источником азотистых веществ, витаминов и других важных питательных веществ. Целью эксперимента было определение влияния концентраций пептона в питательной среде на биосинтез ловастатина.

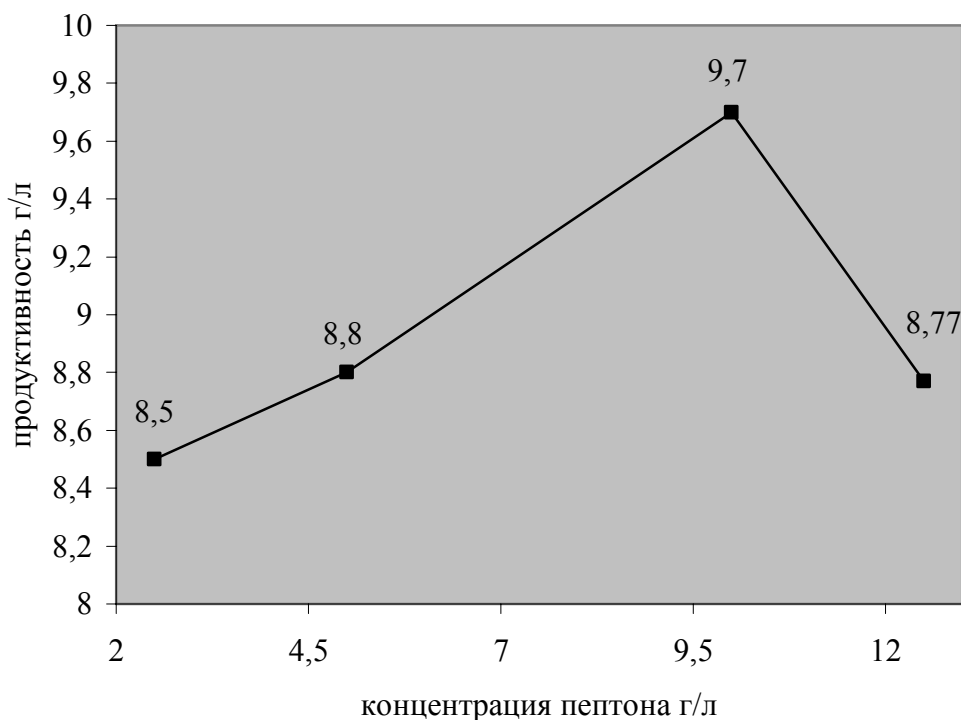


Рисунок 9. Влияние концентраций пептона в питательной среде на биосинтез ловастатина.

Из представленных результатов следует, что оптимальной для биосинтеза ловастатина являлась концентрация пептона в питательной среде 10 г/л, соответственно при этом продуктивность достигла величины 9,7 г/л ловастатина (рис.9).

3.3. Подбор оптимальных параметров для ферментации гриба *P. citrinum* - продуцента компактина.

3.3.1. Влияние количества растворенного кислорода (pO_2) на биосинтез компактина.

Поскольку *P. citrinum* является типичным аэробным микромицетом, чувствительным к количеству растворенного кислорода в культуральной жидкости, была исследована зависимость накопления целевого продукта от насыщения культуральной жидкости растворенным кислородом.

Согласно полученным результатам, концентрация растворенного кислорода (pO_2), поддерживаемого во время ферментации, равная 30%, способствовала максимальной продуктивности, которая составила 6,4 г/л компактина.

3.3.2. Подбор оптимального количества соевой муки в питательной среде.

В процессе исследований было установлено, что оптимальная концентрация соевой муки в питательной среде составляет 40 г/л. При этой концентрации, продуктивность штамма достигала 7,2 г/л компакина. Увеличение концентрации соевой муки относительно оптимума в питательной среде снижало продуктивность, что могло быть обусловлено накоплением излишней биомассы на единицу объема культуральной жидкости и снижением массопередачи кислорода и соответственно снижении концентрации pO_2 .

3.3.3. Подбор оптимальной концентрации сахарозы в питательной среде.

В качестве источника углеводов для биосинтеза компакина используется сахароза. Был проведен ряд экспериментов целью, которых являлось определить оптимальную концентрацию сахарозы, способствующей максимальному накоплению компакина.

Оптимальная концентрация сахарозы в питательной среде для биосинтеза компакина составила 200 г/л, при этом, продуктивность составила 8,4 г/л компакина.

3.3.4. Подбор оптимального режима добавления сахарозы во время биосинтеза компакина.

Сахароза, являясь основным источником углеводов, должна присутствовать в культуральной жидкости в определенной концентрации, при которой скорость биосинтеза поддерживается на максимальном уровне в течении всей ферментации, а накопления компакина достигают максимума к концу процесса. По результатам измерений содержания сахарозы в культуральной жидкости, было определено, что в сутки культура потребляет около 30 г/л сахарозы. По мере проведения ферментаций были исследованы различные режимы добавления сахарозы.

Накопление компакина в культуральной жидкости при добавлении сахарозы в количестве 30 г/л/сутки с 72 часа по 120 час ферментации составило 10,2 г/л.

4. Разработка модифицированной методики очистки и выделения ловастатина для получения препаратов, пригодных для использования в защите растений.

Методы очистки ловастатина для фармакологической промышленности основаны на использовании колоночной хроматографии. Это обусловлено необходимостью использования в фармакологии ловастатина с высокой степенью очистки (не менее 98,5%) и связано с большими затратами и дороговизной методов. Использование препаратов для защиты растений не требует столь высокой степени очистки, поэтому одной из задач данной работы была разработка относительно простого и дешевого метода, позволяющего получать ловастатин с чистотой 90-95%.

Разработанный метод включал следующие этапы: (1) Разделение мицелия и культуральной жидкости. (2) Экстракцию ловастатина (в форме кислоты и лактона) из клеток мицелия с помощью этилацетата. (3) Упаривание этилацетатного раствора до получения осадка в виде коричневой смолы. (4) Лактонизацию препарата методом прогрева осадка при 100-102° С в течение 2-3 часов. (5) Растворение осадка в горячем этилацетате до насыщенного раствора ловастатина и смешивание с н-гексаном (соотношение растворителей 2:1). (6) фильтрацию раствора через бумажный фильтр и упаривание до получения светло-желтых кристаллов ловастатина.

Чистота ловастатина, выделенного с помощью этого метода, согласно данным ВЭЖХ-анализов достигала 90-95%.

Выводы:

1. Обнаружена фунгитоксичность ловастатина при контактном действии *in vitro* на фитопатогенные грибы *C. atramentarium*, *M. grisea* и *St. nodorum*.
2. Показано ингибирующее действие ловастатина на меланиногенез у фитопатогенов, что свидетельствует о существовании у данного статина защитного механизма, позволяющего использовать его в качестве фунгицида непрямого действия.
3. Установлено, что обработка листьев табака ловастатином приводит к подавлению вирусной инфекции, вызванной ВТМ.

4. Антивирусный эффект ловастатина, выразившийся в задержке накопления антигенов, М-вируса подтвержден в полевых опытах на картофеле.
5. Показана способность ловастатина замедлять развитие возбудителей септориоза и стеблевой ржавчины на листьях пшеницы.
6. Установлено что, минимальная эффективная защитная доза ловастатина для пшеницы существенно (на два порядка) ниже минимальной дозы, вызывающей ретардантный эффект.
7. В результате оптимизации параметров культивирования мутантов гриба *A. terreus* был увеличен выход целевого продукта ловастатина с 6,2 до 9,7 г/л.
8. Был оптимизирован процесс биосинтеза компактина новыми мутантами гриба *P. citrinum*, что позволило увеличить выход целевого продукта компактина с 6,4 до 10,2 г/л.
9. Разработан лабораторный технологический регламент производства ловастатина, который послужил базой для разработки сотрудниками ИБФМ им. Г. К. Скрябина по заказу ООО «БИОБЭК» опытно-промышленного регламента на производство ловастатина.

Список публикаций:

1. Джавахиya В. В., Воинова Т. М. “Оптимизация условий культивирования гриба *Aspergillus terreus* – продуцента ловастатина – вещества оказывающего защитное влияние на растения”. Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и генной инженерии. Материалы Всероссийского совещания Голицыно, 16-18 июля 2003 года, стр.198-201.
2. Dzhavakhiya V.V., Voinova T.M. “Optimization of fermentation conditions of culture *Aspergillus terreus*”. 2-й Московский Международный Конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития, Москва 10-14 ноября 2003 года, ч. 1, стр.286.
3. Джавахиya В. В., Украинцева С. Н., Воинова Т. М. “Технологии получения микробиологическим путем холестерин-ингибирующих реагентов-статинов”. Сборник тезисов Международной Конференции «Наука и Бизнес: поиск и

использование новых биомолекул: биоразнообразие, окружающая среда, биомедицина.» Пушино, 10-12 марта, 2004 года, стр.235

4. Dzhavakhiya V.V., Voinova T.M. Newly developed strains-producers of cholesterol-lowering drugs – statins - with industrial level of productivities, Fermentation Technology for industrial production and Recovery Technologies of statins. The Proceedings for the 26th ISTC Japan Conference on Advanced Biotechnologies in Russia/CIS. Япония, Токио, 19 сентября, 2003. стр. 149-159.

5. V.V. Dzhavakhiya, T.M. Voinova. Optimization of Fermentation Conditions for High Lovastatin Producing Mutant 45-50 of Fungus *Aspergillus terreus*. In book: Biotechnology and Industry. Nova Science Publisher Inc. New York, ISBN1-59454-116-7, 2004, pp. 81-87.

6. Джавахиya В.В., Воинова Т.М., Украинцева С.Н. Изучение процесса ферментации штамма гриба *Penicillium crustosum* – продуцента компактина. Сборник 2-я Международной конференции «Наука – Бизнес – Образование» Пушино, 10-13 мая 2005года, стр.71-73.

7. Джавахиya В.В., Воинова Т.М., Подбор оптимальных условий для культивирования мутантов гриба *Penicillium citrinum* – продуцента компактина. Сборник тезисов 3-й Московского Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва 14-18 марта 2005года стр. 95

8. V.V. Dzhavakhiya., T.M. Voinova. Development of optimal conditions for production of compactin by strain 18-12 of *Penicillium citrinum* in labscale fermenter. In book: Biotechnology in Biology and Medicine. Nova Science Publishers Inc. New York, ISBN: 1-60021-092-9, 2006, pp.285-292.

9. Патент RU 2261901 «Штамм гриба *Aspergillus terreus* 44-62 – продуцент ловастатина, промышленный способ выделения ловастатина и способ лактонизации статинов» 2005. Авторы: Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Вавилова Н.А., Санцевич Н. И., Винокурова Н. Т., Кадомцева В. М, Джавахиya В. В., Мишин А. Г.