

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

З.К. Никитина

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

E-mail: nikitinaz@yandex.ru

И.К. Гордонова

к.б.н., вед. науч. сотрудник,

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

E-mail: gordonova777@yandex.ru

Цель работы - изучение возможности использования производственных отходов лекарственного растительного сырья на примере пижмы обыкновенной для биотехнологического получения гидролитических ферментов. Установлено, что изученные микромицеты и бактерии обладают способностью к росту на средах с заменой сахарозы на шрот цветков пижмы, образовавшийся при получении танацехола. Обнаружена секреция целлюлолитических ферментов при глубинном культивировании микромицетов на средах с отходами лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: микромицеты, бактерии, целлюлоза, растительное сырье.

Для цитирования: Никитина З.К. Гордонова И.К. Использование отходов лекарственного растительного сырья для биотехнологического получения гидролитических ферментов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(9): 37–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-06>

Номенклатура заготавливаемых видов лекарственных растений в настоящее время достигает 220–240 наименований, 75% всей массы составляют дикорастущие растения. На территории России произрастает более 20 тысяч видов низших и высших растений, из которых 2500 видов обладают лекарственными свойствами [1, 2]. Фитотерапия и фитопрофилактика сегодня все шире и прочнее внедряются в медицинскую практику, хотя наблюдается волнообразный интерес медиков к ее роли в лечебных процессах — от периода полного забвения использования исторического опыта применения лекарственных растений в современной практической медицине 1970–80 гг. до модного широкомасштабного увлечения растительными средствами в конце XX – начале XXI века [3, 4].

При получении многих галеновых и неогаленовых препаратов в большинстве случаев образуются отходы растительного сырья, содержащие различные биополимеры, в том числе целлюлозу, лигнинцеллюлозу, белки, липиды и т.д. [5]. Ранее было показано, что микромицеты из коллекции мицелиальных грибов ФГБНУ ВИЛАР и некото-

рые виды бактерий могут гидролизовать различные белковые и целлюлозные субстраты [6–8]. Представляет интерес изучение возможности применения указанных биообъектов для получения гидролаз с использованием отходов лекарственного растительного сырья.

К числу важных лекарственных растений, являющихся источником создания высокоэффективных лекарственных средств, относится пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L.) семейства астровые (Asteraceae). Препараты пижмы, изготовляемые из цветочных корзинок, используются как желчегонное, применяющееся при гепатите и холецистите, и противоспазматическое средство. Настой соцветий усиливает амплитуду сердечных сокращений, замедляет ритм сердца. В народной медицине настой соцветий пижмы применяют для лечения неврозов, эпилепсии, заболеваний дыхательных путей, туберкулеза, головной боли. Кроме того, пижма обладает антигельминтным (противоглистным) и инсектицидным свойствами [9].

Цель исследования — изучение возможности использования производственных

отходов лекарственного растительного сырья на примере пижмы обыкновенной для биотехнологического получения гидролитических ферментов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили следующие виды микроорганизмов: бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922 (ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и микромицеты – *Aspergillus flavus* F 52, *Penicillium citrinum* F 54, *P. martensii* F 63 (коллекция ФГБНУ ВИЛАР). Бактерии выращивали на скошенной поверхности мясо-пептонного агара при 37 °С, микромицеты – на среде Чапека при 24 °С. Затем проводили посев тремя уколами на агаризованные среды. Для культивирования микромицетов среда содержала (%): NaNO_3 – 0,2; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; KCl – 0,05; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CaCO_3 – 0,3; агар-агар – 2. При культивировании бактерий использовался минеральный фон среды М9: Na_2HPO_4 – 6 г, KH_2PO_4 – 3 г, NaCl – 0,5 г, NH_4Cl – 1 г, 1 М MgSO_4 – 2 мл, 1 М CaCl_2 – 0,1 мл, тиамин хлорида – 5 мг, агар – 20 г, H_2O – до 1 л. В качестве объекта для конверсии отходов лекарственного растительного сырья использовали шрот цветков пижмы после двух разных загрузок сырья (далее первый и второй образец шрота пижмы) при получении танацехола (экспериментально-производственный отдел ФГБНУ ВИЛАР). Образцы шрота пижмы добавляли к каждой среде в концентрации 0,5 или 2,0%. Гидролитическую активность микроорганизмов оценивали по скорости радиального роста колоний на соответствующих субстратах. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях. Кроме того, измеряли диаметр зон лизиса (если они были) и рассчитывали индексы лизиса по ранее предложенной схеме [6].

Культивирование микромицетов в глубинных условиях проводили в колбах вместимостью 300 мл со 100 мл питательной среды на качалке при скорости вращения 220 об/мин при 26 °С. Посевным материалом служила суспензия спор семисуточных культур дейтеромицета. Количество посевного материала составляло $2,6\text{--}3,6 \times 10^8$ спор на 100 мл среды. Культивирование осуществляли на модифицированной среде Чапека с заменой сахарозы на 0,5% шрота цветков пижмы.

Для определения целлюлазной активности фильтрат культуральной жидкости дейтеромицета, полученный путем ее фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,23 мкм, добавляли

к суспензии микрокристаллической целлюлозы (100 мг/мл) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0) и инкубировали в течение 48 ч (исчерпывающий гидролиз) при температуре 40 °С. После 20-минутного кипячения с последующим центрифугированием при 6000 об/мин в течение 60 мин в супернатанте проводили оценку общей целлюлазной активности с помощью метода определения восстанавливающих сахаров (ВС) с использованием натриевой соли динитросалициловой кислоты [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что рост микроорганизмов в условиях полной или частичной замены легко усвояемых сахаров на трудно метаболизируемые биополимеры (например, нерастворимые белки или целлюлозу) позволяет оценить их потенциальную гидролитическую активность. И бактерии, и, особенно, грибы хорошо росли на средах с заменой сахарозы на шрот цветков пижмы (рис. 1).

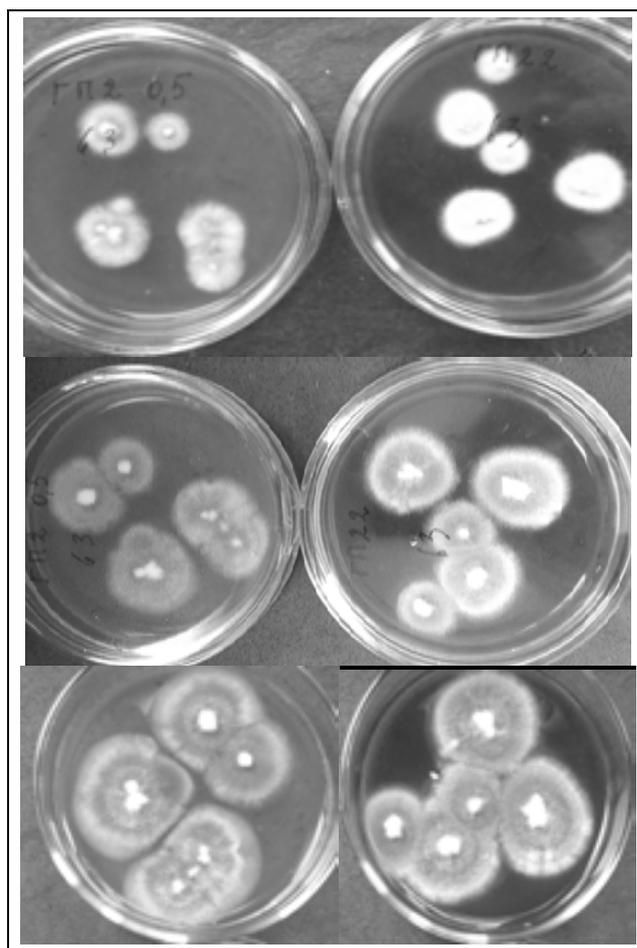


Рис. 1. Рост *P. martensii* F-63 на средах с заменой сахарозы на шрот цветков пижмы; время культивирования: сверху вниз – 3, 4 и 5 суток культивирования; слева – 0,5%, справа – 2% пижмы

На начальном этапе исследования фиксировались скорости радиального роста колоний при культивировании бактерий и микромицетов на средах с полной заменой сахарозы на шрот цветков пажитки. Бактерии *E. coli* хорошо росли на средах с заменой сахарозы на шрот пажитки до 5 суток культивирования, затем рост колоний прекращался, диаметры колоний оставались на одном и том же уровне, хотя зоны лизиса увеличивались. Однако необходимо отметить существенные различия при использовании разных образцов шрота (рис. 2). При введении в среду первого образца на 3-и сутки культивирования не наблюдалось статистически достоверного изменения скорости роста *E. coli* при увеличении концентрации шрота от 0,5 до 2%. Наоборот, на 5–6-е сутки культивирования увеличение концентрации шрота приводило к уменьшению скорости роста (рис. 2,а).

Совершенно другая ситуация наблюдалась для второго образца шрота (рис. 2,б). Повышение концентрации от 0,5 до 2% приводило к значительному увеличению скорости роста на всех этапах культивирования. Полученные результаты могут быть связаны с различиями химического состава двух образцов шрота.

Микромицет *A. flavus* также хорошо рос на средах с заменой 2% сахарозы (стандартная среда

Чапека для культивирования микромицетов) на образцы шрота 0,5 или 2,0% (рис. 3). На всех этапах культивирования на средах с первым образцом шрота пажитки скорость роста *A. flavus* была выше, чем у бактерий. При этом в большинстве случаев не обнаружено статистически достоверного изменения указанного показателя при увеличении концентрации шрота. Только на 3-и сутки культивирования увеличение концентрации шрота приводило к увеличению скорости роста в 1,7 раза (рис. 3,а). На всех этапах культивирования на средах со вторым образцом шрота скорость радиального роста микромицета несколько увеличивалась при изменении его концентрации от 0,5 до 2,0%, однако на 5–7-е сутки это увеличение не было статистически достоверным (рис. 3,б).

Аналогичные результаты были получены и при культивировании *P. citrinum* и *P. martensii* на средах со шротом цветов пажитки (рис. 4). Увеличение в 4 раза концентрации шрота приводило лишь к незначительному увеличению скорости роста микромицета и только на первых этапах культивирования (3–4-е сутки). Анализ изменения скорости роста трех исследованных микромицетов в процессе культивирования свидетельствует о том, что она меняется в очень небольшом диапазоне. Это делает возможным сравнение гидролитиче-

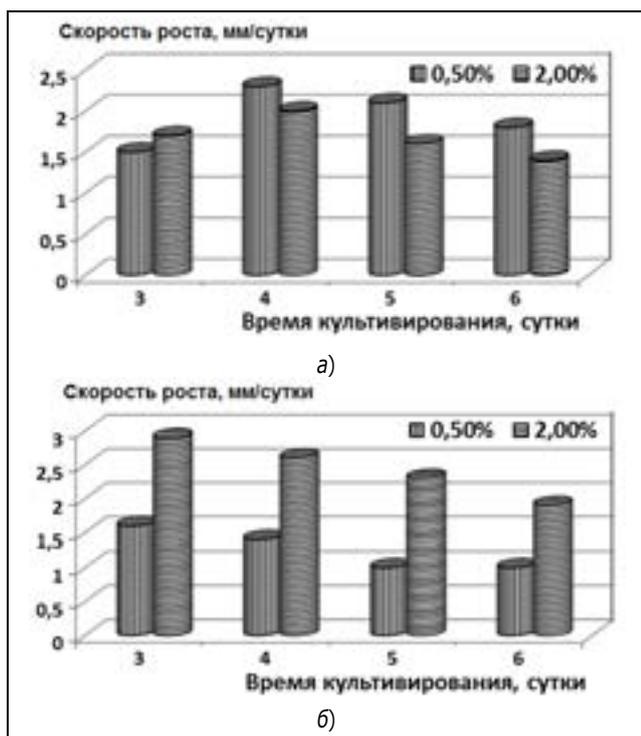


Рис. 2. Скорость радиального роста *E. coli* на средах со шротом цветков пажитки: а – первый образец; б – второй образец

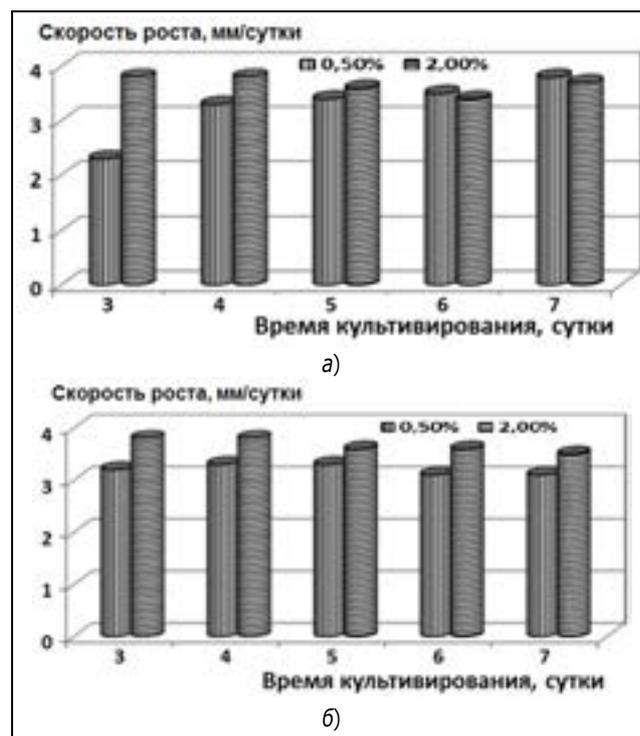


Рис. 3. Скорость радиального роста *A. flavus* на средах со шротом цветков пажитки: а – первый образец; б – второй образец

ской активности грибов по средней скорости роста за все время культивирования.

Наибольшие скорости роста на всех средах наблюдались для *P. martensii* F 63 (рис. 5). Например, при культивировании на среде с 0,5% первого об-

разца шрота скорость роста *P. martensii* была в 2,3 и 2,1 раза больше, чем у *A. flavus* и *P. citrinum* соответственно. Следует отметить, что исследуемый штамм был ранее получен путем адаптации материнского штамма F 47 к росту на целлюлозных субстратах [7].

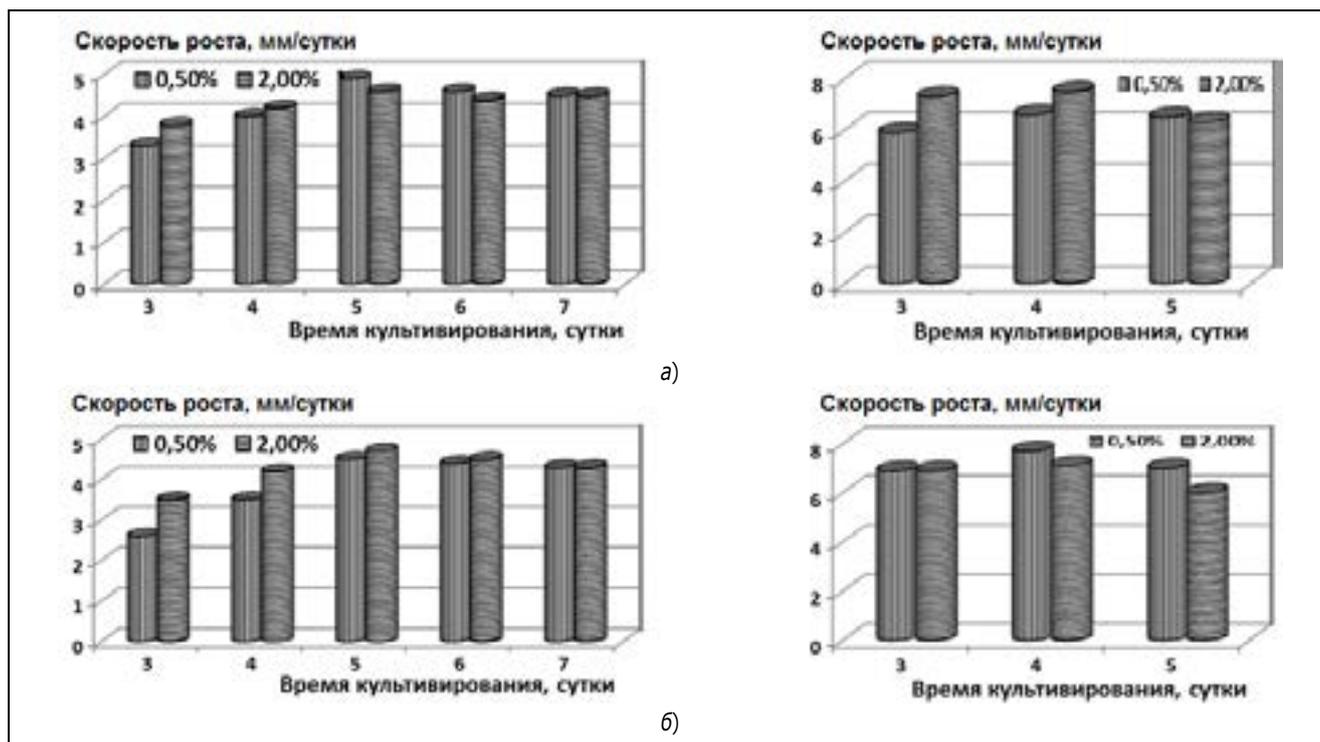


Рис. 4. Скорость радиального роста *P. citrinum* (слева) и *P. martensii* (справа) на средах со шротом цветов пижмы: а – первый образец; б – второй образец

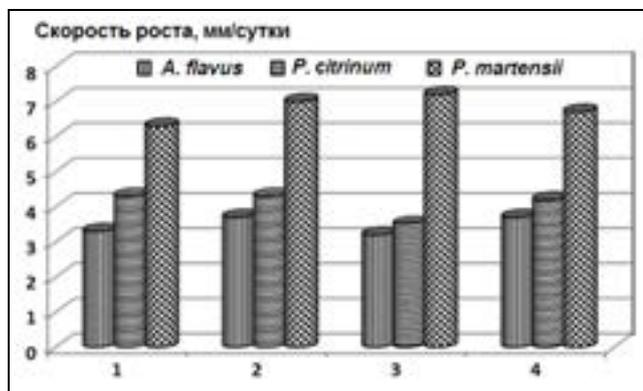


Рис. 5. Средние скорости радиального роста микромицетов на средах со шротом цветов пижмы: 1 – первый образец, 0,5% шрота; 2 – первый образец, 2,0% шрота; 3 – второй образец, 0,5% шрота; 4 – второй образец, 2,0% шрота

Сравнение средних за все время культивирования скоростей роста показало, что изменение концентрации шрота не вызывало статистически достоверного изменения изучаемого показателя. Возможно, что уже при 0,5%-ной концентрации

субстрата достигается оптимальное количество питательных веществ, необходимых для роста культуры. Также не обнаружено статистически достоверных изменений скорости роста в средах с первым и вторым образцами шрота, что, по-видимому, связано с получением этих образцов из одного и того же сырья цветов пижмы одним и тем же способом. Отмеченные выше для *E. coli* различия в характере роста на средах с первым и вторым образцом шрота свидетельствуют о разнице в потребностях питательных веществ у бактерий и грибов.

Появление при культивировании на различных субстратах зон лизиса свидетельствует о секреции микроорганизмами ферментов, гидролизующих соответствующие субстраты [10]. На последних этапах культивирования и бактерии и грибы образовывали зоны лизиса, для визуализации которых использовалась окраска реактивом Люголя [7]. После окраски отчетливо видны области просветления вокруг колоний (рис. 6).

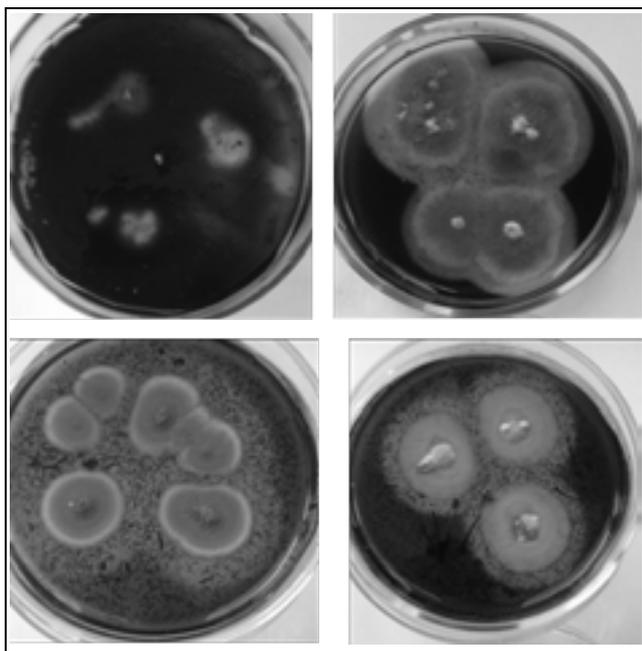


Рис. 6. Колонии и зоны лизиса различных микроорганизмов при росте на средах со шротом цветков пижмы. Вверху слева - *E. coli*, первый образец, 0,5% шрота. Вверху справа – *P. martensii*, второй образец, 0,5% шрота. Внизу слева – *A. flavus*, второй образец, 2% шрота. Внизу справа – *P. citrinum*, второй образец, 2% шрота. Окраска реактивом Люголя

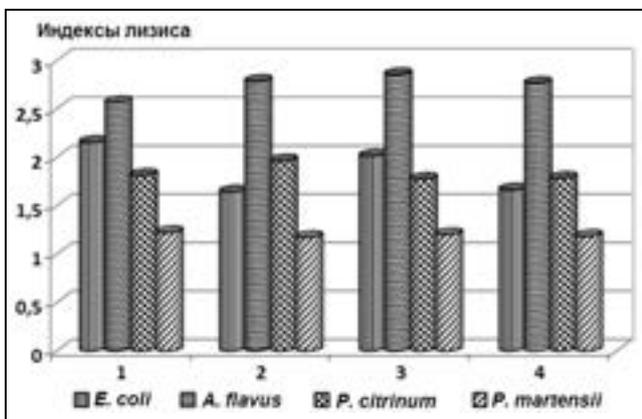


Рис. 7. Индексы лизиса микроорганизмов на 6–7-е сутки роста на средах со шротом цветков пижмы: 1 – первый образец, 0,5% шрота; 2 – первый образец, 2,0% шрота; 3 – второй образец, 0,5% шрота; 4 – второй образец, 2,0% шрота

Наряду с такими параметрами роста микроорганизмов, как диаметр колоний и зон лизиса, важным показателем является индекс лизиса. Индекс лизиса определяется соотношением площади колонии и площади зоны лизиса и характеризует удельную протеолитическую активность культуры, так как площадь колонии пропорциональна ее биомассе, а площадь зоны лизиса – активности секретируемых гидролаз. В связи с этим на следу-

ющем этапе исследования были рассчитаны индексы лизиса микромицетов при росте на средах, содержащих шрот цветков пижмы (рис. 7). Наибольшие индексы лизиса зафиксированы у *A. flavus*; у *P. citrinum* и *E. coli* они были в 1,5 раза меньше, а у *P. martensii* в 2,3 раза меньше.

На заключительном этапе работы было проведено пилотное глубинное культивирование микромицетов на модифицированной среде Чапека с заменой сахарозы на шрот цветков пижмы, образовавшийся в процессе получения танацехола. Можно видеть, что в процессе культивирования всех микромицетов в культуральную жидкость секретировались целлюлолитические ферменты, гидролизующие микрокристаллическую целлюлозу до восстанавливающих сахаров (мкг/мл): *A. flavus* – 150 ± 13 ; *P. citrinum* – 120 ± 11 ; *P. martensii* – 98 ± 8 .

ВЫВОДЫ

1. Все изученные микроорганизмы обладали способностью к росту на средах с заменой сахарозы на шрот цветков пижмы. Скорости роста бактерий были ниже, чем у грибов.
2. Микромицеты образовывали зоны лизиса при поверхностном культивировании и синтезировали целлюлазы при глубинном культивировании.
3. Комплексный анализ гидролитической активности мицелиальных грибов показал, что все исследованные культуры могут быть использованы для конверсии отходов растительного сырья.
4. Поскольку шрот пижмы является многокомпонентным субстратом, можно предполагать образование и других гидролаз в процессе культивирования, что будет являться предметом дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лекарственные растения государственной фармакопеи. Фармакогнозия / Под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева. М.: АМНИ. 1999. 534 с.
2. Чиков П.С. Лекарственные растения. М.: Медицина. 2002. 490 с.
3. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / Под ред. В.Г. Кукеса. М.: Медицина. 1999. 192 с.
4. Лесиовская Е.Е., Пастушенко Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии: Учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-МЕД. 2003. 592 с.
5. Медетханов Ф.А., Овсянников А.П., Хайруллин Д.Д., Муллакаева Л.А. Технология изготовления лекарственных форм: Учеб. пособие. Казань: ФГБОУ ВО Каз. ГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2016. 123 с.
6. Никитина З.К., Гордонова И.К. Использование нативных и модифицированных белков кожи при поиске продуцентов

- протеиназ. // Сборник науч. трудов Междунар. конф. «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине», посвященной 85-летию ВИЛАР 23–25 июня 2016. 401–5
7. Никитина З.К., Гордонова И.К. Разработка методических подходов для поиска продуцентов целлюлаз // Вопросы биол., медицинской и фармацевтической химии. 2018. № 3. С. 27–31. DOI: 29296/25877313-2018-03-05.
 8. Гордонова И.К., Никитина З.К., Зон Хы Чол. Сравнительная оценка протеолитической активности бактерий и микромикетов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. № 9. С. 18–24.
 9. Грязнов М.Ю. Изучение биологических особенностей пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*) в нечерноземной зоне России: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. 2013. 24 с.
 10. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии (Обзор). Часть 1. Поиск микроорганизмов-продуцентов ферментов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 4. С. 23–32.
 11. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигниноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ. 1995. 224 с.

Поступила 16 мая 2019 г.

THE USE OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL WASTE FOR THE BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING OF HYDROLYTIC ENZYMES

© Nikitina Z.K., Gordonova I.K., 2019

Z.K. Nikitina

Dr.Sc. (Biol.), Professor,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: nikitinaz@yandex.ru

I.K. Gordonova

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: gordonova777@yandex.ru

Currently, the drugs based on medicinal plant materials are widely used for the treatment of many chronic diseases. Modern plant-based drugs, as a rule, combine high efficiency, relative safety and wide therapeutic action. When you receive many galenic and neogalenic herbal drugs in most cases, plant raw materials wastes are generate. They usually contain different biopolymers, including cellulose, which can induce under certain conditions the hydrolase synthesis. The study is devoted to the solution of the actual problem connected with the use of plant raw materials wastes for hydrolytic enzymes biotechnological production. As an example of plant material waste were used two samples of *Tanacetum vulgare* flowers waste. Previously the authors have shown that micromycetes from the collection of GNU VILAR have the ability to hydrolyze some insoluble proteins and various types of cellulose. In this regard, the attempt to use these biological objects not only for waste conversion, but also to cellulases obtaining was held.

It was shown that all the investigated filamentous fungi grew well on media with replacement of sucrose to the *Tanacetum vulgare* flowers waste. Micromycetes formed lysis zones in surface cultivation and synthesized cellulases in deep cultivation. Thus, approaches to the use of medicinal plant materials waste for the cellulases production have been developed.

Key words: micromycetes, bacteria, cellulose, plant raw material.

For citation: Nikitina Z.K., Gordonova I.K. The use of medicinal plant raw material waste for the biotechnological obtaining of hydrolytic enzymes. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(9):37–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-06>

REFERENCES

1. Lekarstvennye rasteniya gosudarstvennoj farmakopei. Farmakognosiya / Pod red. I.A. Samylinoj, V.A. Severceva. M.: AMNI. 1999. 534 s.
2. Chikov P.S. Lekarstvennye rasteniya. M.: Medicina. 2002. 490 s.
3. Fitoterapiya s osnovami klinicheskoy farmakologii / Pod red. V.G. Kukesa. M.: Medicina. 1999. 192 s.
4. Lesiovskaya E.E., Pastushenkov L.V. Farmakoterapiya s osnovami fitoterapii: Ucheb. posobie. M.: GEOTAR-MED. 2003. 592 s.
5. Medethanov F.A., Ovsyannikov A.P., Hajrullin D.D., Mullakaeva L.A. Tekhnologiya izgotovleniya lekarstvennyh form: Ucheb. posobie. Kazan': FGBOU VO Kaz .GAVM im. N.E. Bauman. 2016. 123 s.
6. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Ispol'zovanie nativnyh i modifirovannyh belkov kozhi pri poiske producentov proteinaz. // Sbornik науч. трудов Междунар. конф. «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине», посвященной 85-летию ВИЛАР 23 2016. 401–5 □25 iyunya
7. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Razrabotka metodicheskikh podhodov dlya poiska producentov cellyulaz // Voprosy biol., medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2018. № 3. S. 27–31. DOI: 29296/25877313-2018-03-05.
8. Gordonova I.K., Nikitina Z.K., Zon Hy Chol. Sravnitel'naya ocenka proteoliticheskoy aktivnosti bakterij i mikromicetov // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2017. № 9. S. 18–24.
9. Gryaznov M.Yu. Izuchenie biologicheskikh osobennostej pizhmy obyknovnoy (Tanasetum vulgare) v nechernozemnoj zone Rossii: Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. M. 2013. 24 s.
10. Yakovleva M.B., Nikitina Z.K. Skringing-metody v biotekhnologii (Obzor). Chast' 1. Poisk mikroorganizmov-producentov fermentov // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2016. № 4. S. 23–32.
11. Sinicyn A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Biokonversiya ligninocellyuloznyh materialov. M.: Izd-vo MGU. 1995. 224 s.