

ИЗУЧЕНИЕ РОСТОВЫХ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ САПРОФИТНЫХ ЛИНИЙ *CLAVICEPS PURPUREA* В ПОГРУЖЕННОЙ КУЛЬТУРЕ

Р.И. Бобылева

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел агробиотехнологии,

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

E-mail: vilarnii@mail.ru

Н.С. Цыбулько

к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, отдел агробиотехнологии,

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

E-mail: ostafevo11@yandex.ru

На сегодняшний день большое внимание уделяется сапрофитным штаммам-продуцентам алкалоидов спорыньи и разработке технологий получения их глубинным способом. С помощью УФ-индуцированного мутагенеза и последующей селекции были отобраны сапрофитные линии гриба *Claviceps purpurea*, характеризующиеся способностью как к росту, так и к синтезу индольных производных алкалоидной природы в погруженной культуре. При изучении морфолого-физиологических и биохимических особенностей полученных линий гриба *C. purpurea* в средах Tg и T25 установили, что культура гриба представляет собой суспензию мицелия, состоящую из питательного субстрата и неплотных шарообразной формы колоний различного размера. Центр колоний слегка уплотнен, от их краев отходят разветвленные в разные стороны жидкого питательного субстрата гифы. При культивировании гриба в среде Tg цвет мицелия молочно-белый, образования конидий и синтеза индольных производных алкалоидной природы не наблюдали. В среде T25 изначально молочно-белый цвет культуральной жидкости в процессе культивирования окрашивался в бежевый, а к концу ферментации приобретал сиреневый оттенок. Цвет 20-суточного влажного мицелия также пигментировался и приобретал сиреневый оттенок разной интенсивности. С 12–14-х суток культивирования в культуральной жидкости наблюдали образование бесцветных конидий овальной формы с закругленными концами. Синтез индольных производных алкалоидной природы начинался с 9-х суток культивирования и достигал максимального уровня на 19-е сутки роста гриба. Также установили, что линия № 2 накапливает больше мицелия и уровень синтеза вторичных метаболитов у этой линии немного выше, чем у линии № 1, что позволяет отобрать линию № 2 для проведения дальнейших селекционных работ по конструированию промышленно значимого сапрофитного штамма-продуцента эргоалкалоидов.

Ключевые слова: спорынья, эргоалкалоиды, мицелий, культуральная жидкость, глубинная культура.

Для цитирования: Бобылева Р.И., Цыбулько Н.С. Изучение ростовых и биосинтетических особенностей сапрофитных линий *Claviceps purpurea* в погруженной культуре. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(7):45–49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-07>

На основе эргоалкалоидов (ЭА) *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne в настоящее время выпускается более 100 лекарственных средств [1].

В России (ФГБНУ ВИЛАР) разработаны такие препараты, как абергин, новокристин, белламинал и эргометрина малеат различного спектра действия [2].

В промышленных масштабах для получения лекарственного сырья, содержащего ЭА, используют паразитарные и сапрофитные культуры [3–5].

В последние годы большое внимание уделяется сапрофитным штаммам-продуцентам алкалоидов спорыньи и разработке технологий получения их глубинным способом. Использование таких технологий позволяет получать стандартное сырье

независимо от времени года, разрабатывать экологически чистое безотходное производство, сокращать время выращивания, снижать производственные затраты и т.д. [6, 7].

Из литературных источников известно, что наиболее эффективным индуктором для получения штаммов сапрофитной культуры *C. purpurea* с измененными морфолого-физиологическими и биохимическими характеристиками является УФ-облучение. [3, 4, 6, 7].

С помощью УФ-мутагенеза и последующей селекции были получены сапрофитные линии гриба *C. purpurea*, продуцирующие индольные производные алкалоидной природы в погруженной культуре.

Цель исследования – изучение морфолого-физиологических и биохимических особенностей сапрофитных линий *C. purpurea* и выбор перспективной линии для проведения дальнейших селекционных работ по конструированию промышленно значимого сапрофитного штамма-продуцента ЭА.

Задачи исследования:

изучение морфолого-физиологических особенностей сапрофитных линий *C. purpurea* (Fr.) Tul. в жидких питательных средах (ростовой, продуктивной);

изучение динамики накопления массы сухого мицелия и индольных производных алкалоидной природы сапрофитными линиями *C. purpurea* (Fr.) Tul. в условиях глубинного культивирования;

выбор перспективной линии для проведения дальнейших селекционных работ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили сапрофитные линии *C. purpurea* № 1 и № 2, полученные в результате УФ-мутагенеза в отделе агробиотехнологии ФГБНУ ВИЛАР.

Погруженное культивирование сапрофитных линий проводили по схеме: среда Т2 [3] > среда ростовая (Тg) [4] > среда продуктивная (Т25) [4]. Раствором аммиака рН питательных сред доводили до 5,2 и регистрировали при помощи рН-метра Five Easy F20 (Mettler Toledo, Швейцария). Стерилизацию осуществляли паром под давлением 0,5 атм при температуре (112 ± 2) °С в течение 30 мин.

При проведении исследования в каждую колбу со средой Тg вносили по 1 мл суспензии конидий плотностью от 2,0 до $3,0 \cdot 10^5$ шт/мл, выращенной на скошенной питательной среде Т2. В колбы с продуктивной средой Т25 вносили по 10% (объемных) инокулюма, полученного на среде Тg. Выращивание культуры гриба на среде Т2 осуществляли в течение 30 суток, на среде Тg – 7 суток, а на среде Т25 – 28 суток в колбах вместимостью 500 мл с 50 мл питательной среды на качалке, совершающей 100 об/мин, при температуре 24 ± 1 °С.

Морфолого-физиологические исследования сапрофитных линий гриба *C. purpurea* проводили визуально, с помощью лупы МБО-2 и микроскопа АЛЬТАМИ БИО. При этом акцентировали внимание на особенностях роста культуры, пигментации культуральной жидкости и собственно мицелия. Конидиогенез регистрировали методом микроско-

пии по числу конидий в одном миллилитре суспензии [8]. Накопление воздушно сухой массы мицелия проводили весовым методом и выражали в граммах на 100 мл питательной среды [8],

Для количественного определения суммы индольных производных алкалоидной природы мицелий гриба отделяли от фильтрата, помещали в морозильную камеру с температурой -20 °С на сутки. Через сутки навеску замороженного мицелия (± 500 мг), растирали в ступке с речным песком, затем добавляли 2 мл 4%-ного раствора винной кислоты в 50%-ном метаноле. Экстракцию действующих веществ проводили на кипящей водяной бане в течение 3 мин при постоянном перемешивании.

Определение суммы индольных производных алкалоидной природы осуществляли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 540 нм после конденсации с *n*-диметиламинобензальдегидом (в пересчете на эрготамин тартрат – стандартный образец (ФС 42-1070-87) по методу Румпеля [9]. При росте в жидких питательных средах сапрофитные линии гриба могут синтезировать все группы эргоалкалоидов (клавиновые алкалоиды, простые производные лизергиновой кислоты, пептидные эргоалкалоиды, лактамные эргоалкалоиды), а также и лизергиновую кислоту. Все они будут давать специфическое окрашивание с *n*-диметиламинобензальдегидом. Продуктивность сапрофитных линий рассчитывали как сумму индольных производных алкалоидной природы и выражали в % (на сухую массу мицелия).

Обработку полученных экспериментальных данных проводили с применением программы Microsoft Excel. Определяли средние значения и стандартные отклонения ошибки средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфолого-физиологическая характеристика сапрофитных линий гриба *C. purpurea* (Fr.) Tul. в ростовой среде (Тg). Визуально начало роста наблюдали на вторые сутки культивирования. На 6–7-е сутки роста мицелиальная масса состояла из неплотных шарообразной формы колоний с диаметром 1,5–2,0 мм, которая занимала весь объем питательной среды в колбе. Центр колоний был слегка уплотнен, от их краев отходили разветвленные в разные стороны жидкого питательного субстрата гифы. Цвет мицелия молочно-белый, образования конидий не наблюдали.

Морфолого-физиологические и биохимические особенности сапрофитных линий гриба *C. purpurea* (Fr.) Tul. в продуктивной среде T25.

Интенсивный рост культуры в жидкой питательной среде T25 начинался со вторых суток культивирования. Культура гриба представляла собой суспензию мицелия, состоящую из питательного субстрата и неплотных шарообразной формы колоний различного размера. Центр колоний слегка уплотнен, от их краев отходят разветвленные в разные стороны жидкого питательного субстрата гифы (рис. 1).

Начиная с 12–14-х суток культивирования, в культуральной жидкости наблюдали образование

бесцветных конидий овальной формы с закругленными концами.

Окраска культуральной жидкости изменялась в зависимости от возраста культуры. Изначально молочно-белый цвет культуральной жидкости через 7–9 дней культивирования окрашивался в бежевый, а к концу ферментации ее цвет приобретал сиреневый оттенок. Влажный мицелий 20-суточной культуры гриба *C. purpurea* также пигментировался и его цвет, как и цвет культуральной жидкости приобретал сиреневый оттенок (рис. 2). Установлено, что пигментация как культуральной жидкости, так и мицелия наиболее выражена у линии № 2.

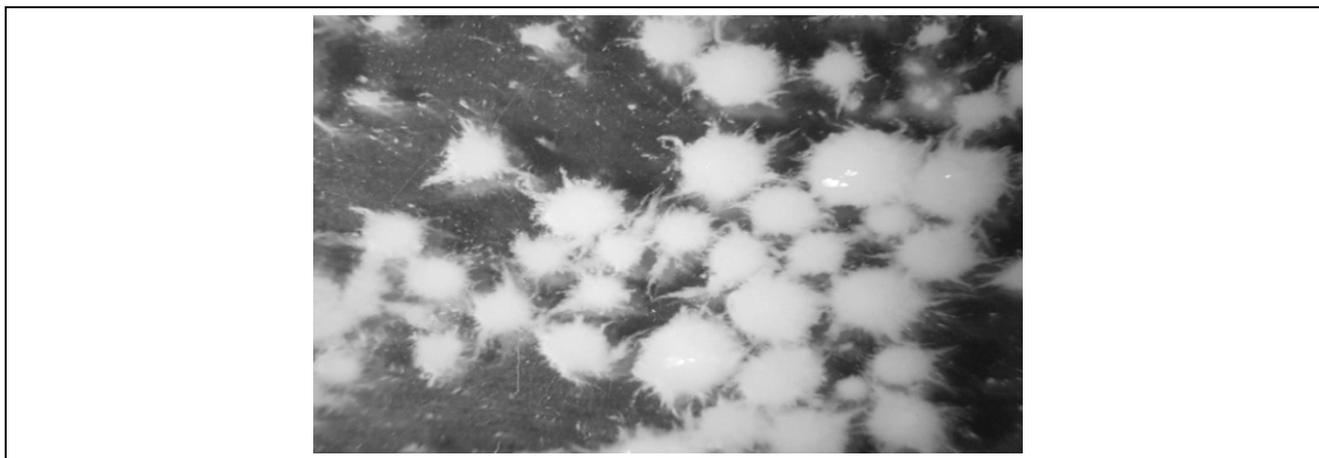


Рис. 1. Рост *C. purpurea* в среде T25, 10-е сутки роста (лупа МБ0-2, ув. x50)

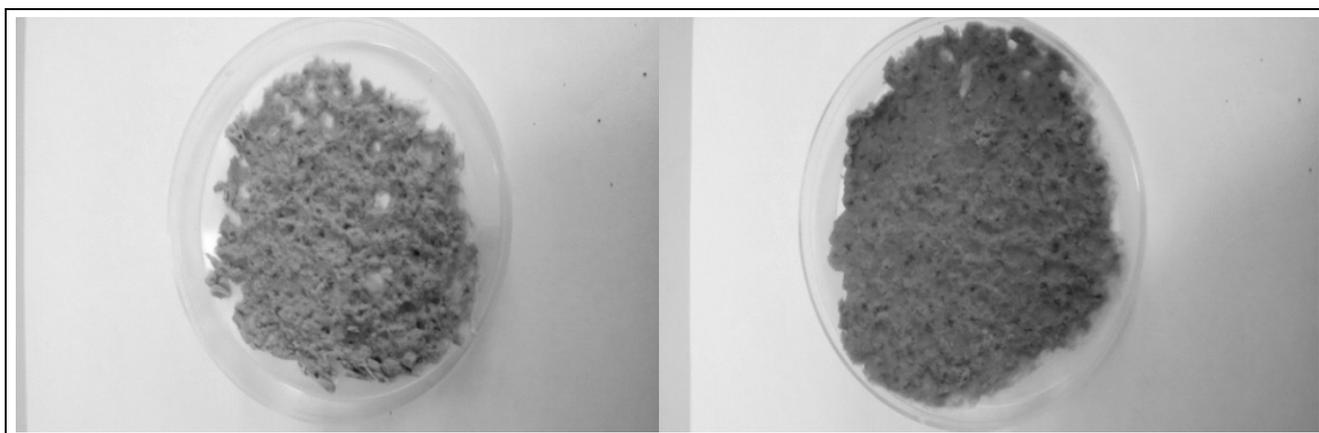


Рис. 2. Влажный мицелий сапрофитных линий гриба *C. purpurea* (20 суток): линия № 1 (слева); линия № 2 (справа)

При выращивании сапрофитных линий гриба спорыньи в среде T25 (рис. 3) наблюдали хороший рост, который активно начинался со вторых суток культивирования и достигал своего максимального значения по массе на 19-е сутки. В последующие сутки наблюдали незначительное снижение нарастания массы мицелия. Важно отметить, что

линия № 2 накапливает больше мицелия, что имеет существенное значение, так как основные действующие вещества накапливаются в мицелии.

Оценку способности гриба синтезировать индольные производные алкалоидной природы в продуктивной среде T25 проводили на 9-, 14-, 19-, 21- и 28-е сутки роста (рис. 4).

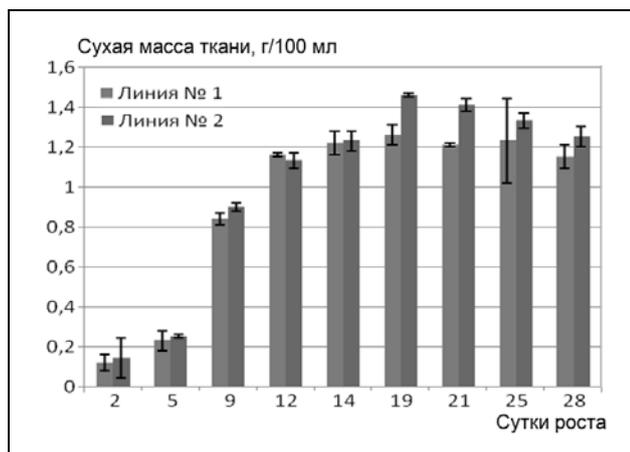


Рис. 3. Динамика накопления сухой массы мицелия сапрофитными линиями гриба спорыньи в среде T25

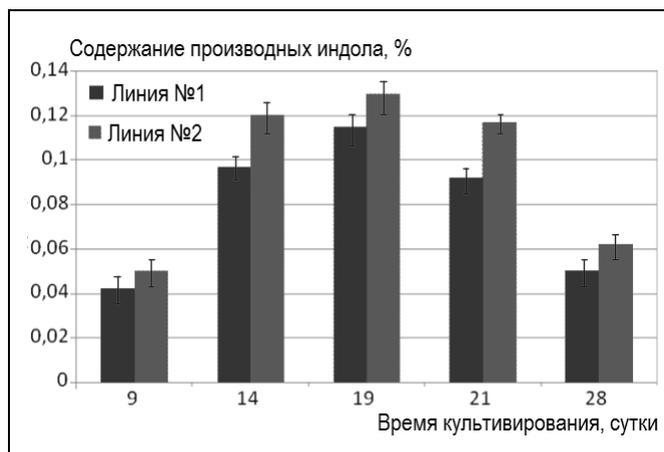


Рис. 4. Динамика накопления индольных производных алкалоидной природы сапрофитными линиями гриба спорыньи в среде T25

В результате проведенных исследований установили (рис. 4), что сапрофитные линии синтезируют индольные производные алкалоидной природы в погруженной культуре. Максимальный уровень синтеза наблюдали на 19-е сутки роста.

Сравнительный анализ данных, представленных на рис. 3 и 4, позволил установить, что на 19-е сутки роста в 100 мл питательного субстрата сапрофитная линия № 1 накапливает 1,21 г массы сухого мицелия и синтезирует 0,118% (на сухой вес) индольных производных алкалоидной природы. Линия № 2 накапливает больше мицелия (1,45 г) и также синтезирует большее количество вторичных метаболитов (0,128%), что позволяет для проведения дальнейших селекционных работ по конструированию промышленно значимого штамма-продуцента отобрать линию № 2.

ВЫВОДЫ

При культивировании сапрофитных линий гриба *C. purpurea* в жидких питательных средах (Tg, T25) культура гриба представляет собой суспензию мицелия, состоящую из питательного субстрата и колоний шарообразной формы различного размера с уплотненным центром. От краев колоний отходят разветвленные в разные стороны жидкого питательного субстрата гифы.

При росте сапрофитных линий гриба спорыньи в среде Tg пигментации мицелия и образования конидий не наблюдалось.

При выращивании гриба спорыньи в среде T25 наблюдалась пигментация культуральной жидкости, влажного мицелия и образование конидий. Пигмен-

тация как культуральной жидкости, так и влажного мицелия наиболее выражена у линии № 2.

При выращивании сапрофитных линий в среде T25 отмечалось образование биомассы и синтез вторичных метаболитов, достигающих максимальных значений на 19-е сутки культивирования.

Для проведения дальнейших селекционных работ по конструированию промышленно значимого штамма-продуцента эргоалкалоидов может использоваться линия № 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sharma Niti, Sharma Vinay K., Manikyam Hemanth Kumar and Krishna Acharya Bal. Ergot Alkaloids: A Review on Therapeutic Applications. *European Journal of Medicinal Plants*. 2016; 14(3): 1–17.
2. Трумпле Т.Е., Колхир О.К., Омельницкий П.П. и др. Труды ВИЛАР. Химия, технология, медицина. 2000; 200–209.
3. Барсегян А.Г. Разработка методов селекции и повышения продуктивности штаммов-продуцентов эргоалкалоидов в сапрофитных условиях культивирования: Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2009. 172 с.
4. Бойченко Л.В. Биосинтез эргоалкалоида агроклавина мутантным штаммом микроскопического гриба *Claviceps fusiformis* ВКМФ-2609: Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2004. 154 с.
5. Шаин С.С. Возделывание спорыньи на ржи. Обзорная информация «Лекарственное растениеводство». М.: ЦБНТИ Минмедбиопрот. 1987; 4: 50 с.
6. Tudzynsk P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 57(5–6):593–605.
7. Tudzynski B., Holter K., Correia T. Arntz C, Grammel N., Keller U. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* 1999; 261(1):133–141.
8. Савин П.С. Особенности регуляции конидиогенеза в условиях глубинного культивирования элитного инфек-

ционного материала спорыньи *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.: Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2007. 125 с.

dwertes von Einzelsklerotein des Muttercorns. Farmazie. 1955; 10(3): 585–606.

9. Rumpel W. Ein facheserienmabige Bestimmung des Alkaloi-

Поступила после доработки 9 апреля 2021 г.

STUDY OF GROWTH AND BIOSYNTHETIC FEATURES OF SAPROPHYTIC *CLAVICEPS PURPUREA* LINES IN SUBMERGED CULTURE

© Authors, 2021

R.I. Bobyleva

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow, Russia)
E-mail: vilarnii@mail.ru

N.S. Tsybulko

Ph.D. (Pharm.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow, Russia)
E-mail: ostafevo11@yandex.ru

In our days, much attention is paid to saprophytic strains-producers of ergot alkaloids and the development of technologies for their production by submerged cultivation. Using UV-induced mutagenesis and subsequent selection, the saprophytic lines of the fungus *Claviceps purpurea* were selected, characterized by the ability to grow and synthesize indole derivatives of an alkaloid nature in a submerged culture. The studying the morphological, physiological and biochemical characteristics of the obtained lines of the fungus *C. purpurea* in media Tg and T25, showed that the culture of the fungus is a suspension of mycelium, consisting of a nutrient substrate and loose spherical colonies of various sizes. The center of the colonies is slightly compacted, from their edges branching out in different directions of the liquid nutrient substrate hyphae. When the fungus was cultivated in a Tg medium, the color of the mycelium was milky white, the formation of conidia and the synthesis of indole derivatives of an alkaloid nature were not observed. In medium T25, the initially milky white color of the culture liquid turned beige during cultivation, and by the end of fermentation it acquired a lilac hue. The color of the 20-day-old wet mycelium was also pigmented and acquired a lilac shade of varying intensity. From 12 to 14 days of cultivation, the formation of colorless oval conidia with rounded ends was observed in the culture liquid. The synthesis of indole derivatives of an alkaloid nature began on the 9th day of cultivation and reached the maximum level on the 19th day of the growth of the fungus. We also found that line No. 2 accumulates more mycelium and the level of synthesis of secondary metabolites in this line is slightly higher than in line No. 1, which allows us to carry out further breeding work on the construction of an industrially significant saprophytic strain-producer of ergoalkaloids (EA), select line number 2.

Key words: ergot, ergot alkaloids, mycelium, culture liquid, submerged culture.

For citation: Bobyleva R.I., Tsybulko N.S. Study of growth and biosynthetic features of saprophytic *Claviceps purpurea* lines in submerged culture. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(7):45–49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-07>

REFERENCES

1. Sharma Niti, Sharma Vinay K., Manikyam Hemanth Kumar and Krishna Acharya Bal. Ergot Alkaloids: A Review on Therapeutic Applications. European Journal of Medicinal Plants. 2016; 14(3): 1-17.
2. Trumpe T.E., Kolhir O.K., Omel'nickij P.P. i dr. Trudy VILAR. Himija, tehnologija, medicina. 2000; 200-209.
3. Barsegjan A.G. Razrabotka metodov selekcii i povysheniya produktivnosti shtammov-producentov jergoalkaloidov v saprofitnyh uslovijah kul'tivirovaniya: Diss. ... kand. biol. nauk. M. 2009. 172 s.
4. Bojchenko L.V. Biosintez jergoalkaloida agroklovina mutantnym shtammom mikroskopicheskogo griba *Claviceps fusiformis* VKMF-2609: Diss. ... kand. biol. nauk. M. 2004. 154 s.
5. Shain S.S. Vozdelyvanie sporyn'i na rzhii. Obzornaja informacija «Lekarstvennoe rastenievodstvo». M.: CBNTI Minmedbioprom. 1987; 4: 50 s.
6. Tudzynsk P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001; 57(5-6):593–605.
7. Tudzynski B., Holter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. Mol. Gen. Genet. 1999; 261(1):133-141.
8. Savin P.S. Osobennosti reguljacii konidiogeneza v uslovijah glubinnogo kul'tivirovaniya jelitnogo infekcionnogo materiala sporyn'i *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.: Diss. ... kand. biol. nauk. M. 2007. 125 s.
9. Rumpel W. Ein facheserienmabige Bestimmung des Alkaloidwertes von Einzelsklerotein des Muttercorns. Farmazie. 1955; 10(3): 585-606.