

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ШТАММА *CLAVICEPS PURPUREA* (FRIES) TULASNE VKMF-2641D В САПРОФИТНОЙ КУЛЬТУРЕ

Р.И. Бобылева

к.б.н.

П.С. Савин

к.б.н., вед. науч. сотрудник, группа биотехнологии,

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

E-mail: savin-pavel@list.ru

Актуальность. Штамм гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D – продуцент эрготамина используют в промышленном производстве для получения лекарственного сырья (склероциев спорыньи), содержащего пептидный эргоалкалоид – эрготамин. Использование штамма гриба *C. purpurea* VKMF-2641D для получения эрготамина в сапрофитной культуре позволит обеспечить возрастающие с каждым годом потребности фармацевтической промышленности в стандартном лекарственном сырье независимо от времени года, снизить производственные затраты, создать экологически чистое производство.

Материал и методы. Отправной и обязательной работой при решении как научных, так и практических задач, связанных с использованием грибов-паразитов *C. purpurea* (Fries) Tulasne в качестве продуцентов биологически активных соединений в сапрофитной культуре, является получение мицелиальной культуры гриба спорыньи, растущей на искусственных питательных средах и разностороннее ее изучение. Представлен экспериментальный материал по получению мицелиальной культуры спорыньи из склероция штамма гриба-паразита *C. purpurea* VKMF-2641D и изучению ростовых и некоторых морфологических и физиолого-биохимических особенностей при культивировании ее на искусственных питательных средах (Т2, Тg и Т25).

Результаты. При перенесении кусочка склероция на поверхность агаризованной среды Т2 визуально наблюдали рост мицелия вокруг кусочка склероция (5-6-е сутки), который затем разрастался и занимал всю поверхность скошенной агаризованной среды Т2 в пробирке не только с поверхности, но проникал внутрь питательного субстрата, уплотнялся. Цвет мицелия, изначально белый, с возрастом (на 20-30-е сутки) приобретал фиолетовую окраску, пигмент диффундировал в питательную среду. На 14-30-е сутки роста гриб начинал активно образовывать конидии. Плотность суспензии конидий в 10 мл смыва с поверхности мицелия (на 30-е сутки роста) составила $5,8 \pm 0,20 \cdot 10^9$ шт/мл. При выращивании гриба спорыньи в жидкой питательной среде Т25 культура гриба представляла собой суспензию мицелия и незначительного количества конидий в культуральной среде. Окраска культуральной жидкости варьировала в зависимости от возраста культуры. Изначально молочно-белый цвет культуральной жидкости к концу ферментации изменялся и становился серым или иногда бежевым, синтеза эргоалкалоидов не наблюдали.

Выводы. Проведенные эксперименты показали, что при переводе штамма гриба-паразита *C. purpurea* VKMF-2641D в сапрофитные условия культивирования (поверхностное, глубинное) гриб хорошо растет, однако в исследуемых условиях генетическая информация, ответственная за синтез эрготамина, не реализуется. В тоже время исходная генетическая информация не исчезает, она сохраняется, но для ее реализации требуются специфические условия.

Ключевые слова: штамм VKMF-2641D, эргоалкалоиды, рост.

Для цитирования: Бобылева Р.И., Савин П.С. Изучение морфологических и физиолого-биохимических особенностей штамма *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D в сапрофитной культуре. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(12):57–62. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-12-09>

Штамм *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D – продуцент эрготамина, семейство спорыньевые (Clavicipitaceae), класс Сумчатые грибы (*Ascomycetes*), используют в паразитарной культуре для получения лекарственного сырья (склероциев спорыньи) [5]. В склероциях штамма *C. purpurea* VKMF-2641D синтезируется эрготамин, принадлежащий к эргопептиновой группе эргоалкалоидов

(ЭА), производным лизергиновой кислоты (ЛК). У алкалоидов этой группы в качестве заместителя в кислотном радикале ЛК содержится оксазолопирроло-пиразининовая система – циклол (рис. 1).

Циклольный фрагмент эрготамина состоит ($R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2C_6H_5$) из одной молекулы α -гидрокси-аланина (I), одной молекулы фенилаланина (II) и одной молекулы пролина (III).

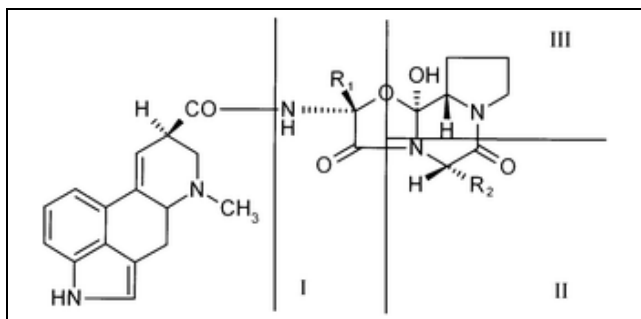


Рис. 1. Общая структурная формула пептидных эргоалкалоидов [8]

Эрготамин обладает *альфа*-адреноблокирующим действием и используется в качестве фармацевтической субстанции для создания лекарственных средств (эрготал, эргометринамалеат, эрготамин тартрат, эрготамин гидротартрат, беллатаминал, кофетамин и др.) для медицинской практики [4, 7].

Получение эрготамин в сапрофитной культуре актуально, так как это позволит обеспечить возрастающие с каждым годом потребности фармацевтической промышленности в стандартном лекарственном сырье независимо от времени года, снизить производственные затраты, создать экологически чистое производство и так далее.

Цель работы – изучение ростовых, морфологических и физиолого-биохимических особенностей штамма гриба-паразита *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D при выращивании его в сапрофитной культуре поверхностным и глубинным способами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила мицелиальная форма гриба *C. purpurea* (Fries) Tulasne, полученная из склероциев селекционного эрготаминового штамма VKMF-2641D (из коллекции ФГБНУ ВИЛАР).

Для проведения исследований были использованы зрелые склероции спорыньи с известным содержанием целевого алкалоида (не менее 0,6% от сухой массы). При получении мицелиальной формы гриба спорыньи склероций делили на две части. Одну из них измельчали в порошок и использовали для химического анализа [2]. Вторую половинку, склероция поверхностно дезинфицировали 0,2%-ным раствором сулемы (4 мин), затем в 96%-ном спирте этиловом (2 мин), обжигали над пламенем спиртовой горелки, очищали складчатую поверхность склероциев, срезая обожженные

участки, затем снова погружали в спирт этиловый в течение 2 с, обжигали над пламенем горелки, не допуская подгорания ткани. Обработанные таким способом склероции разрезали на части размером 1-2 мм и переносили в пробирки на поверхность скошенной агаризованной питательной среды (Т2) в состав которой входили, г/л: сахароза – 100,0; дрожжевой экстракт – 0,1; аспарагин – 10,0; KH_2PO_4 – 0,25; KCl – 0,125; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; агар-агар – 18,0. Культивирование проводили в течение 30 суток при температуре 24 ± 1 °С. В активном состоянии культуру поддерживали методом периодических пересевов.

Для получения суспензии конидий к 30-суточной культуре гриба спорыньи, выращенной на среде Т2 в асептических условиях, добавляли стерильную дистиллированную воду и при помощи микробиологической петли аккуратно снимали культуру с поверхности агаризованной среды. Для отделения конидий от кусочков среды, воздушного и поверхностного мицелия, полученную суспензию пропускали через двойной марлевый фильтр. В полученной таким способом водной суспензии подсчитывали количество конидий, используя камеру Горяева.

Погруженное культивирование проводили по схеме: среда Т2 > среда ростовая (Тг) > среда продуктивная (Т25). Состав питательных сред, г/л: **Тг**: глюкоза – 100,0; лимонная кислота – 10,0; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,007; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,006; рН до 5,2 доводили аммиаком; **Т25**: сахароза – 250,0; лимонная кислота – 15; дрожжевой экстракт 0,1; KH_2PO_4 – 0,5; KCl – 0,125; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,007; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,006; рН до 5,2 доводили аммиаком. Стерилизацию сред осуществляли паром под давлением 0,5 атм при температуре 112 ± 2 °С в течение 30 мин.

При проведении исследований в каждую колбу со средой Тг вносили по 1 мл суспензии конидий плотностью от 2,0 до $3,0 \cdot 10^5$ шт/мл, выращенную на скошенной питательной среде Т2. В колбы с продуктивной средой Т25 вносили по 10% (объемных) инокулюма, полученного на среде Тг. Выращивание культуры гриба на среде Тг осуществляли в течение 7 суток, на среде Т25 – 25 суток в колбах вместимостью 500 мл с 50 мл питательной среды на подвесной качалке с эллиптической траекторией качания, совершающей 98–100 об/мин, в темноте, при температуре 24 ± 1 °С.

Морфолого-физиологические исследования культуры гриба *S. purpurea* в условиях *in vitro* 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, образовании конидий. Конидиогенез регистрировали методом микроскопии по числу конидий в одном миллилитре суспензии. Подсчет конидий проводили при помощи камеры Горяева по формуле

$$X = \frac{a \cdot 400 \cdot v \cdot 1000}{b},$$

где X – искомое количество конидий в 1 мл; a – сумма конидий, сосчитанных в определенном объеме камеры; b – количество сосчитанных малых квадратов; v – разведение суспензии.

При культивировании гриба в среде Т25 в динамике определяли изменение значений рН (потенциометрически), накопление биомассы весовым методом, потребление сахарозы фенольным методом [6], фосфор колориметрическим методом [6]. Количественное содержание и качественный состав алкалоидов в склероциях спорыньи анализировали, как описано в работе [2]. Для предварительной оценки присутствия алкалоидов в культуральной жидкости и влажном мицелии использовали спектрофотометрический метод, основан-

ный на определении суммарного содержания индольных производных алкалоидной природы после их конденсации с *n*-диметиламинобензальдегидом (*n*-ДМБА) по методу Румпеля [9].

Обработку полученных экспериментальных данных проводили с применением программы Statistika-6.0, Microsoft Excel. Определяли средние значения и стандартные отклонения ошибки средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показано, что при перенесении кусочка склероция в пробирку (А) на поверхность агаризованной среды Т2 на 5-6-е сутки визуально наблюдали рост мицелия вокруг кусочка склероция (Б). В последующие сутки мицелий гриба разрастался и занимал всю поверхность скошенной агаризованной среды Т2 в пробирке (В) не только с поверхности, но проникал внутрь питательного субстрата, уплотнялся. Цвет мицелия, изначально белый (Б, В), с возрастом (на 20-30-е сутки) приобретал фиолетовую окраску (Г), пигмент диффундировал в питательную среду (Д).

На 14-30-е сутки роста гриб начинал активно образовывать бесцветные конидии овальной, продолговатой формы с закругленными концами (рис. 3). Плотность суспензии конидий в 10 мл смыва с поверхности мицелия (на 30-е сутки роста) составила $5,8 \pm 0,20 \cdot 10^9$ шт/мл.

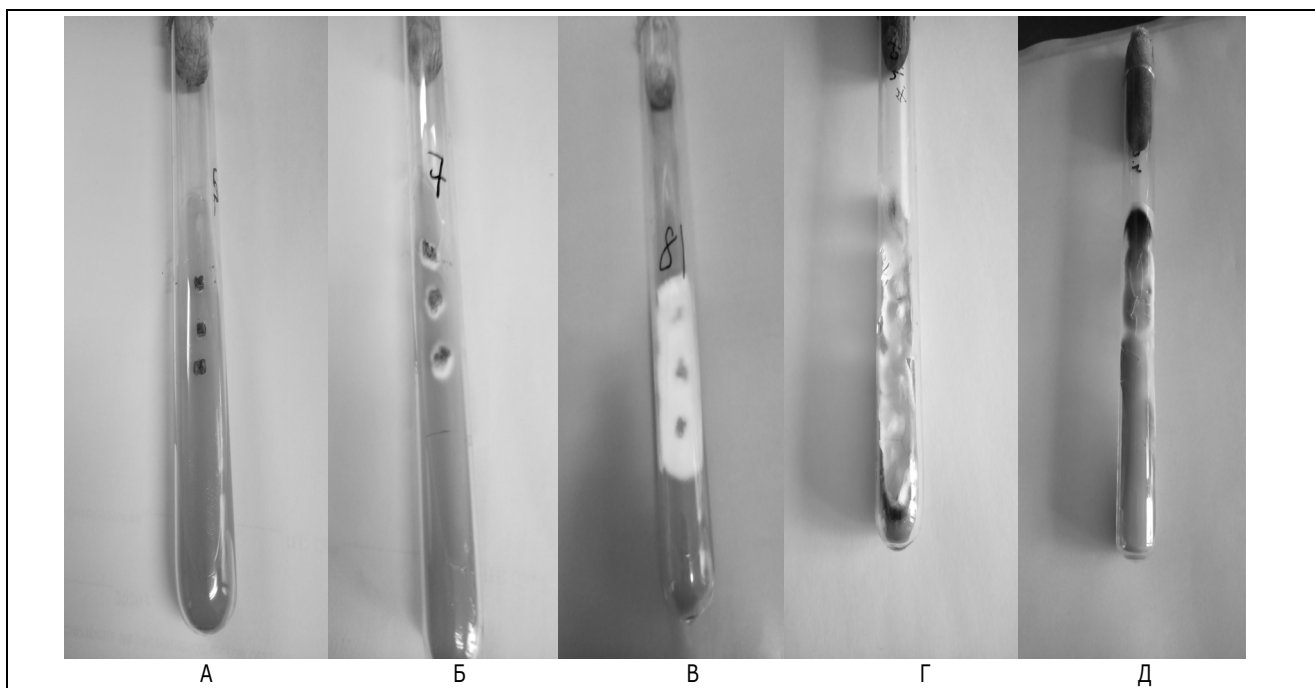


Рис. 2. Рост и развитие *S. purpurea* (Fr.) Tulasne в пробирке на поверхности скошенной агаризованной среды Т2: А – кусочек склероция *S. purpurea*; Б – 5-6-е сутки роста; В – 10-е сутки; Г – 20-30-е сутки роста; Д – пигмент диффундирует в питательную среду

При расसेве конидиальной суспензии на агаризованную среду Т2 в чашки Петри образование колоний начиналось с прорастания конидий. Из проростка формировались молодые гифы, которые разрастались по поверхности агаровой среды. Нижние «веточки» гиф проникали вглубь среды и

в ней образовывали гифы субстратного мицелия, а верхние – росли по поверхности среды, формируя гифы промежуточного мицелия от которого отходили гифы воздушного мицелия. На более поздних стадиях роста гриба спорыньи (от 7 до 30 суток) на среде Т2 в чашках Петри вырастали хорошо

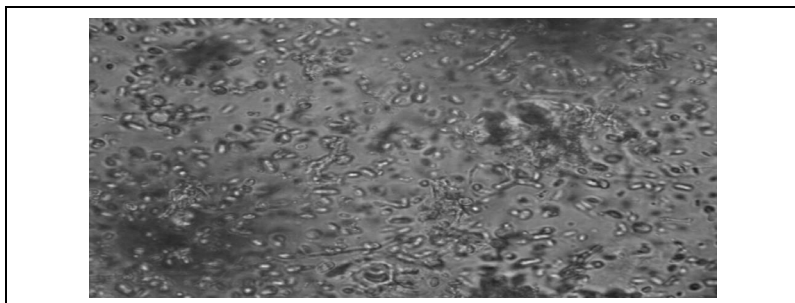


Рис. 3. Микропрепарат суспензии конидий гриба *Claviceps* (микроскоп АЛЬТАМИ БИО /x100/)

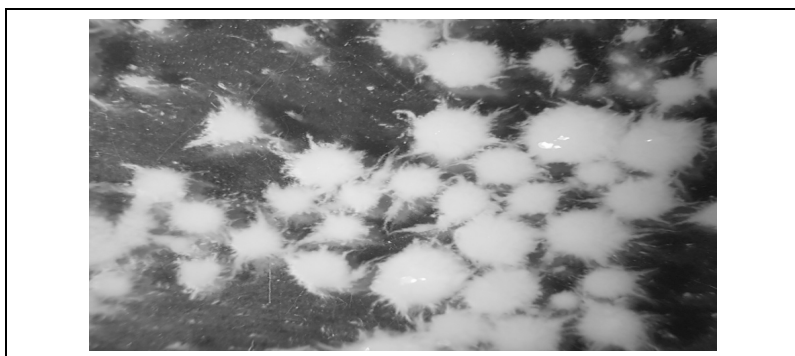


Рис. 4. Рост *S. purpurea* в среде Т25 (10-е сутки, лупа МБО-2 /x 50/)

развитые колонии округлой формы с возвышающимся центром. Поверхность колоний войлочная, цвет белый, край колоний ровный иногда фестончатый. С возрастом центральная часть колоний приобретала бежевый оттенок, становилась бархатистой. На 20–30-е сутки роста поверхность колоний приобретала фиолетовую окраску, пигмент диффундировал в питательную среду. Размеры колоний варьировали в зависимости от возраста культуры, толщины агаризованного слоя среды, густоты засева и т.д.

При культивировании гриба спорыньи в жидкой среде Т25 (рис. 4) культура гриба представляла собой суспензию мицелия. Мицелий представлен неплотными шарообразной формы колониями различного размера, их центр слегка уплотнен, от краев колоний отходили разветвленные в разные стороны жидкого питательного субстрата гифы.

Начиная с 12–14-х суток культивирования, в культуральной жидкости наблюдали образование конидий, ее окраска варьировала в зависимости от возраста культуры. Изначально молочно-белый цвет культуральной жидкости к концу ферментации изменялся и становился серым или иногда бежевым.

В результате физиолого-биохимических исследований установили (рис. 5), что интенсивный рост культуры начинался со вторых суток и достигал своего максимума на 12-е сутки (около 14 г/л сухой биомассы), затем наблюдалось постепенное снижение ростовых показателей. Резких изменений значений pH по ходу ферментации не обнаружили. Наблюдалось незначительное понижение его значений от 5,2 (исходный) до 3,6–3,8 на 10–12-е сутки культивирования с последующим воз-

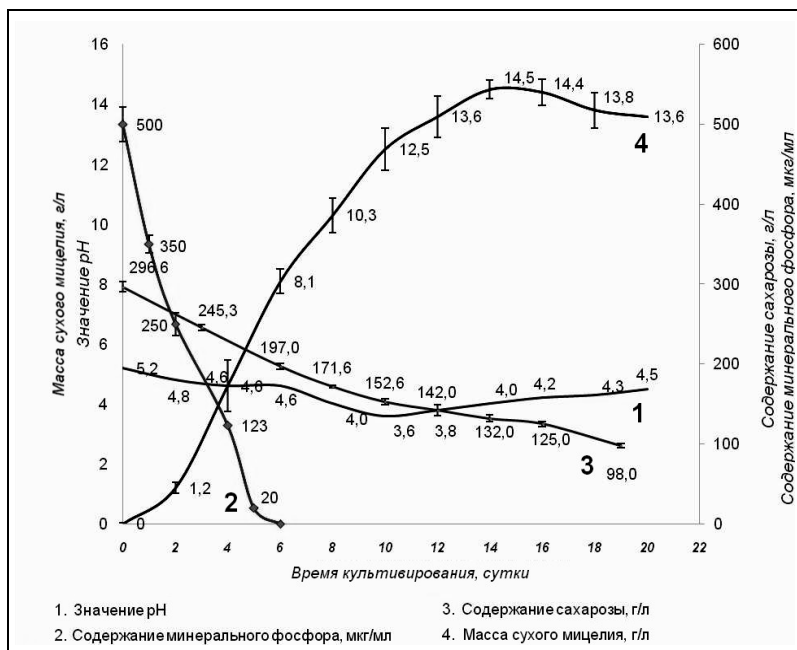


Рис. 5. Динамика изменения значений pH (1), потребления минерального фосфора (2), сахарозы (3) и накопления биомассы (4) при росте штамма ВКМФ-2641D на качалке в среде Т25

растением до 4,3–4,5 на 19–20-е сутки. Потребление минерального фосфора и сахарозы начиналось с первых суток роста гриба спорыньи. Важно отметить, что минеральный фосфор потреблялся полностью на 5–6-е сутки, но сахароза за 19 суток культивирования грибом потреблялась не вся, а в культуральной среде большое ее количество (около 10%) оставалось не потребленной.

Для оценки биосинтетической способности гриба спорыньи анализировали влажный мицелий, фильтрат культуральной жидкости, а также мицелий, высушенный до воздушно-сухого состояния. Во всех проанализированных образцах алкалоидов обнаружено не было, что свидетельствует о том, что в исследуемых условиях генетическая информация ответственная за синтез ЭА не реализуется. По-видимому, для ее реализации требуются специфические условия. Так, в работе [3] показано, что одним из факторов, способствующих частичной реализации генетической информации, ответственной за синтез ЭА грибом-паразитом, в условиях *in vitro* являются гормоноподобные эффекторы. Выявление таких факторов – предмет дальнейших исследований.

Результаты экспериментов показали, что при выращивании штамма гриба-паразита *C. purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D в сапрофитной культуре (поверхностный, глубинный способы) гриб хорошо растет, однако в исследуемых условиях генетическая информация, ответственная за синтез эрготаминна не реализуется. В тоже время исходная генетическая информация не исчезает, она сохраняется, но для ее реализации требуются специфические условия.

Выводы

В результате проведенных экспериментов установлено следующее:

при развитии штамма гриба-паразита *C. Purpurea* (Fries) Tulasne VKMF-2641D как на агаризованной, так и в жидкой питательной среде Т25 наблюдается рост мицелия гриба и образование конидий;

при выращивании гриба-паразита в продуктивной среде Т25 большое количество сахарозы (примерно 10%) остается не потребленной;

в исследуемых условиях генетическая информация, ответственная за синтез ЭА, не реализуется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсегян А.Г., Савина Т.А., Бобылева Р.И. Селекция вариантов линий *Claviceps purpurea* эрготаминового штамма со способностью к биосинтезу индольных производных в сапрофитной культуре. Сборник научных трудов «Нетрадиционные ресурсы, инновационные технологии и продукты». 2007; 16: 211–215.
2. Комарова Е.Л., Шаин С.С. Идентификация селекционных штаммов спорыньи по алкалоидному составу индивидуальных склероциев. Химико-фармацевтический журнал. 1998; 32(8): 34–37.
3. Савина Т.А., Савин П.С., Бобылева Р.И. Экзогенная регуляция биопродуктивности сапрофитных штаммов спорыньи. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 12(21): 29–34.
4. Трумпле Т.Е., Колхир О.К., Омельницкий П.П. и др. Труды ВИАР. Химия, технология, медицина. М. 2000: 200–209.
5. Шаин С.С. Биорегуляция продуктивности растений. Изво «Оверлей». М. 2005. 218 с.
6. Унифицированные методы анализа вод / Под редакцией Ю.Ю. Лурье. Из-во. «Химия». М. 1971. 375 с.
7. Sharma Niti, Sharma Vinay K., ManikyamHemanth Kumar and Krishna Acharya Bal. Ergot Alkaloids: A Review on Therapeutic Applications. European Journal of Medicinal Plants. 2016; 14(3): 1–17.
8. Tudzynsk P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001; 57 (5-6): 593–605.
9. Rumpel W. Einfache serienmabige Bestimmung des Alkaloidwertes von Einzelsklerotein des Muttercorns. Farmazie. 1955; 10(3): 585–606.

Поступила 28 июня 2021 г.

ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF SAPROPHYTIC CULTURE OF *CLAVICEPS PURPUREA* (FRIES) TULASNEVKMF-2641D STRAIN

© R.I. Bobyleva, P.S. Savin, 2021

R.I. Bobyleva

Ph.D. (Biol.)

P.S. Savin

Ph.D., (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Herbs (Moscow, Russia)

E-mail: savin-pavel@list.ru

Relevance. The strain of the fungus *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne BKMf-2641D is used in parasitic culture (on rye crops) to obtain medicinal raw materials containing the peptide ergoalkaloid ergotamine. The relevance of the study consists in solving the problem of saprophytic cultivation of the *C. purpurea* BKMf-2641D fungus strain for the production of ergotamine, which will allow the pharmaceutical industry to meet its growing needs for standard medicinal raw materials every year, regardless of the season, reduce production costs, create environmentally friendly production, and so on. Obtaining a mycelial culture of an ergot fungus is a starting point in solving both scientific and practical problems associated with the use of fungi - parasites *C. purpurea* (Fries) Tulasne as producers of biologically active compounds in a saprophytic culture and subsequently allows a comprehensive study of the cultivation of such a culture within artificial nutrient media.

Material and methods. This paper presents the results of experiments aimed at obtaining a mycelial culture of ergot from the sclerotia of the strain of the parasite fungus *C. purpurea* BKMf-2641D with the subsequent study of growth, some morphological, physiological and biochemical characteristics of its cultivation in artificial nutrient media (T2, Tg and T25).

Results. It was experimentally established that five to six days after placing a piece of sclerotium on the surface of agar medium T2, the growth of mycelium was visually recorded around it. The subsequent growth of the mycelium was accompanied by its compaction and filling both the entire surface of the slant T2 agar medium and inside the nutrient substrate. As the mycelium grew on days 20-30, its color changed from white to purple due to the fact that the pigment diffused into the nutrient medium. The fungus began to actively form conidia on the 14-30th day of growth. The density of the suspension of conidia in 10 ml of washout from the mycelium surface was $5.8 \pm 0.2 \times 10^9$ pcs/ml on the 30th day of growth. The culture of the fungus in liquid nutrient medium T25 was a suspension of mycelium and a small amount of conidia. The color of the culture liquid varied depending on the age of the culture: from milky white at the beginning to gray or sometimes beige at the end of fermentation. In this case, the synthesis of ergot alkaloids was not observed.

Conclusion. The experiments showed that the transfer of the parasitic fungus strain *C. purpurea* BKMf-2641D to saprophytic cultivation conditions (both superficial and deep) ensures good growth of the fungus. However, under the conditions of the study, the genes responsible for the synthesis of ergotamine did not work. At the same time, these genes are not lost, but specific conditions are required for their work.

Key words: strain BKMf-2641D, ergot alkaloids, growth.

For citation: Bobyleva P.I., Savin P.S. Analysis of morphological, physiological and biochemical features of saprophytic culture of *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne BKMf-2641D strain. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(12):57–62. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-12-09>

REFERENCES

1. Barsegjan A.G., Savina T.A., Bobyleva R.I. Selekcija variantnyh linij *Claviceps purpurea* jergotaminovogo shtamma so sposobnost'ju k biosintezu indol'nyh proizvodnyh v saprofitnoj kul'ture. Sbornik nauchnyh trudov «Netradicionnye resursy, innovacionnye tehnologii i produkty». 2007; 16: 211–215.
2. Komarova E.L., Shain S.S. Identifikacija selekcionnyh shtammov sporyn'i po alkaloidnomu sostavu individual'nyh sklerocijev. Himiko- farmaceuticheskij zhurnal. 1998; 32(8): 34–37.
3. Savina T.A., Savin P.S., Bobyleva R.I. Jezzogenaja reguljacija bioproduktivnosti saprofitnyh shtammov sporyn'i. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii. 2018; 12(21): 29–34.
4. Trumpe T.E., Kolhir O.K., Omel'nickij P.P. i dr. Trudy. VILAR. Himija, tehnologija, medicina. M. 2000: 200–209.
5. Shain S.S. Bioreguljacija produktivnosti rastenij. Iz-vo «Overlej». M. 2005. 218 s.
6. Unificirovannye metody analiza vod / Pod redakciej Ju.Ju. Lur'e. Iz-vo. «Himija». M. 1971. 375 s.
7. Sharma Niti, Sharma Vinay K., ManikyamHemanth Kumar and Krishna Acharya Bal. Ergot Alkaloids: A Review on Therapeutic Applications. European Journal of Medicinal Plants. 2016; 14(3): 1–17.
8. Tudzynsk P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001; 57 (5-6): 593–605.
9. Rumpel W. Einfache serienmabige Bestimmung des Alkaloidwertes von Einzelsklerotein des Muttercorncorns. Farmazie. 1955; 10(3): 585–606.