

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

На правах рукописи



ЗИНУРОВ МИХАИЛ РАМИСОВИЧ

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ
ALTERNARIA ALTERNATA И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ
ПРЕПАРАТА ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Сысоева М.А.

Казань – 2026

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МУК – методические указания по методам контроля

УФ – ультрафиолетовое излучение

ИК – инфракрасная спектроскопия

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ч. – чистый реактив, содержащий основное вещество более 98 %

ч.д.а – чистый для анализа реактив, содержащий основное вещество 99 %

х.ч. – химически чистый реактив, содержащий основное вещество 99,9 %

о.с.ч. – особо чистый реактив, содержащий основное вещество более 99,9 %

КОЕ – колониеобразующие единицы

БАД – биологически активная добавка

ПЦР – анализ, полимеразная цепная реакция

ОФС – общая фармакопейная статья

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

18S рРНК – 18S рибосомные рибонуклеиновые кислоты

МЕ – количество фермента, которое при заданных условиях за 1 мин катализирует превращение одного микромоля субстрата

ТД₅₀ – токсическая доза, при которой токсичность имеет место в 50 % случаев

IC₅₀ – количество конкретного ингибирующего вещества, необходимого для ингибирования *in vitro* тестируемого

ГКА – глюкозо-картофельная агаризованная питательная среда

ГПА – глюкозо-пептонная агаризованная питательная среда

КГ – картофельно-глюкозная среда

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ХСТ – хозяин-специфичные фитотоксины

ТеК – тенуазоновая кислота

ТТ – тентоксин

АОЛ – альтернариол

ФТ – фитотоксины

АМЭ – метиловый эфир

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

CRISPR-Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) термин, который означает систему, используемую для направленного редактирования геномов

РПГА – реакция пассивной гемагглютинации

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Биотехнологический потенциал грибов рода <i>Alternaria</i>	15
1.2 Лектины как биотехнологический продукт с высоким функциональным потенциалом	25
1.3 Роль лектинов в процессах патогенеза и устойчивости растений	31
1.4 Анализ различных методов и условий культивирования микромицетов рода <i>Alternaria</i>	42
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	51
2.1 Материалы и методы, использованные в работе	51
2.2 Выделение чистых культур микромицетов рода <i>Alternaria</i>	53
2.3 Скрининг выделенных изолятов рода <i>Alternaria</i> на способность к синтезу лектинов	54
2.4 Молекулярно-генетическая идентификация изолята <i>Alternaria alternata</i> 4	54
2.5 Культивирование изолята микромицета <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на питательных средах	55
2.6 Подбор состава питательной среды для получения биологически активных лектинов при жидкофазном культивировании	56
2.7 Выделение лектинов микромицета рода <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039	57
2.8 Подготовка эритроцитов к реакции гемагглютинации и их модификация	58
2.9 Хроматография лектина <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039	58
2.10 Изучение влияния лектина <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на рост и развитие растений	59
2.11 Изучение влияния лектина <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на устойчивость растений к фитопатогенам	60
2.12 Этапы получения препарата Барьер на основе лектина <i>Alternaria alternata</i>	61

ВКПМ F-2039

2.13	Определение токсичности и мутагенной активности препарата Барьер	63
2.14	Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)	63
2.15	Определение температуры и рН-значений активности и устойчивости препарата Барьер	65
2.16	Определение влияния ионов металлов на активность препарата Барьер	65
2.17	Определение влияния NaCl на активность препарата Барьер	65
2.18	Определение концентрации белка	66
2.19	Влияние препарата Барьер на рост и развитие микроорганизмов	66
2.20	Определение действия препарата Барьер в полевых условиях на зерновые и бобовые культуры	67
2.21	Статистическая обработка результатов	67
	ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ЛЕКТИНОВ И РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ЕГО ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОДУКЦИИ	68
3.1	Выделение активного продуцента лектинов из природных объектов	68
3.2	Молекулярно-генетическое определение видовой принадлежности выделенного штамма <i>Alternaria alternata</i> 4	73
	ГЛАВА 4. ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ РОСТА <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> ВКПМ F-2039 И ПРОИЗВОДСТВА АКТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ	76
4.1	Определение временного периода для получения биологически активных лектинов	78
4.2	Определение влияния отдельных компонентов питательной среды и эффективных добавок для получения биологически активных лектинов	80
	ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКТИНА <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> ВКПМ F-2039 И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЕГО СПОСОБНОСТИ К ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ПАТОГЕНОВ	87

5.1	Определение влияния лектина гриба <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на энергию прорастания и всхожесть семян зерновых и бобовых культур	87
5.2	Определение влияния лектина <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на рост и развитие зерновых и бобовых культур	90
5.3	Влияние степени очистки лектинов <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 на ростостимулирующую активность растений	95
5.4	Определение действия лектина микромицета <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039 как средство защиты растений	99
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА BIOTEХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> ВКПМ F-2039 ГЛУБИННЫМ СПОСОБОМ		
6.1	Материальный баланс получения высокоактивных лектинов <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039	111
6.2	Разработка аппаратурно-технологической схемы биотехнологии получения высокоактивных лектинов <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F-2039	114
ГЛАВА 7. ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗРАБОТАННОГО ПРЕПАРАТА БАРЬЕР		
7.1	Оценка токсичности препарата Барьер на примере микроорганизмов	119
7.2	Оценка мутагенного потенциала препарата Барьер в тесте Эймса	120
7.3	Физико-химические свойства препарата Барьер	121
7.4	Определение температурного диапазона действия препарата Барьер и его термостабильность	121
7.5	Определение pH-диапазона действия препарата Барьер и его стабильность при различных значениях pH среды	123
7.6	Устойчивость препарата Барьер к хлориду натрия и к ионам металлов	124
7.7	Общая характеристика и исследование препарата Барьер в полевых условиях	126
7.8	Перспективы использования препарата Барьер в медицинских целях	128

ГЛАВА 8. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАРЬЕР	131
8.1 Режим работы проектируемого производства во времени	131
8.2 Планирование капитальных затрат	132
8.3 Планирование материально-технического обеспечения	133
8.4 Расчёт потребности в воде и электроэнергии	134
8.5 Расчёт численности и фонда заработной платы персонала	136
8.6 Расчет сметы себестоимости готовой продукции	137
8.7 Расчет себестоимости единиц готовой продукции препарата Барьер на основе высокоактивных лектинов <i>Alternaria alternata</i> ВКПМ F 2039	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	143
ПРИЛОЖЕНИЕ А	170
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	171
ПРИЛОЖЕНИЕ В	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одно из главных направлений современного развития сельского хозяйства связано с поиском новых продуцентов и разработкой новых биопрепаратов, направленных на увеличение устойчивости растений к фитопатогенам и урожайности, с целью обеспечения продовольственной безопасности и защиты окружающей среды.

Среди известных препаратов, обладающих ростостимулирующим действием или способным к защите растений от насекомых и фитопатогенов, можно назвать такие как Салибор, Полидон, Экост и другие. Однако, в большинстве данных препаратов основа представлена химическими соединениями, нарушающими экологию окружающей среды, что создает опасность для здоровья человека и животных.

Основой наиболее известных биопрепаратов являются биомасса и споры бактерий и грибов. Среди них такие, как Фитоспорин, Ризобакт, Биофил, Агрофил, Триходермин и другие. Ростостимулирующее действие установлено для экстрактов растений, это такие препараты как: Локер, линейка Экстрафлор, Циркон и другие. Количество биопрепаратов на основе продуктов метаболизма клеток значительно меньше.

Новым актуальным направлением в получении биопрепаратов для сельского хозяйства являются разработки, направленные на использование в качестве основы метаболитов микроорганизмов, участвующих в процессе патогенеза. К таким соединениям можно отнести лектины фитопатогенных микромицетов. Лектины – это белки или гликопротеины, обладающие гемагглютинирующей активностью и избирательной способностью узнавать и взаимодействовать с углеводными детерминантами на клеточных поверхностях. Благодаря их свойствам и функциям лектины микромицетов являются перспективными препаратами для использования в отраслях народного хозяйства,

в частности, растениеводстве.

Анализ распространения фитопатогенов показал, что грибы рода *Alternaria* способны поражать многие важные в промышленном и сельскохозяйственном отношении культуры. Именно против них в настоящее время в мире проводятся масштабные и высокочатратные мероприятия с целью разработки высокоэффективных, биотехнологических мер по защите растений от альтернариоза. С другой стороны, установлено, что грибы рода *Alternaria* способны к образованию значительного количества различных биологически активных соединений, в том числе и лектинов, и используются в биотехнологических процессах в качестве биопродуцентов. В связи с этим было актуально выявить наиболее активных продуцентов из грибов рода *Alternaria* и разработать технологию их культивирования для получения лектинов.

Степень разработанности темы исследования. Большой вклад в изучение лектинов грибов, внесли исследования Singh R.S., Houser J, Brahi R., Santos M, Coelho V.B., Sharon N. Была показана способность к синтезу лектинов грибами таких родов как *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*. Рассмотрены вопросы питательных сред, условий культивирования грибов.

Действие лектинов микромицетов на растительные объекты отражено в небольшом количестве опубликованных работ, в основном связанных с защитой растений от насекомых. Инсектицидные свойства лектинов грибов установлены у грибов-базидиомицетов, дикариотических грибов, у маннозо-специфичного лектина из *P. chrysogenum* и лектина *P. parasitica*.

Ростостимулирующее и фунгицидное действие на семена гороха показано у поверхностных лектинов *F. solani*. Для лектинов других микромицетов, в том числе грибов рода *Alternaria*, подобные работы не проводились.

Однако сами грибы рода *Alternaria* активно изучаются в связи со способностью синтезировать большое число биологически активных соединений. Это отражено в работах Салимовой Д.Р., Далиновой А.А., Ганнибала Ф.Б., Pinto

V.E.F. и других исследователей. Имеются данные по использованию грибов рода *Alternaria* при получении токсинов, ферментов и противоопухолевых препаратов.

Цель диссертационной работы – разработать биотехнологию культивирования микромицета *Alternaria alternata* с получением высокоактивных лектинов, для создания на их основе биопрепарата, и обосновать эффективность его применения в растениеводстве.

Для достижения цели решались следующие задачи:

1. Выделить новые изоляты грибов рода *Alternaria*, провести их скрининг, обосновать выбор продуцента, способного к синтезу активных лектинов и депонировать его во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов.

2. Провести подбор питательных сред для погруженного жидкофазного культивирования грибов рода *Alternaria*, определить период накопления, количество и активность синтезируемых им лектинов.

3. Разработать состав питательной среды жидкофазного культивирования гриба рода *Alternaria*, для увеличения выхода биомассы продуцента и повышения титра активности лектина.

4. Исследовать ростостимулирующие действие лектинов микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 на семенах зерновых и бобовых культур (пшеница, горох).

5. Доказать способность лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 к защите растений от фитопатогенных микроорганизмов, в том числе, повышая их индуцированную устойчивость.

6. Разработать биотехнологию получения биопрепарата на основе высокоактивных лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 и сформировать нормы его качества.

Научная новизна. С поверхности зерна пшеницы выделен новый штамм грибов рода *Alternaria*, способный к синтезу активных лектинов. Молекулярно-генетический анализ показал его принадлежность к виду *A. alternata*. Штамм

депонирован во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ F-2039 (акт от 22.12.2025, Приложение А).

Установлено, что период синтеза лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 связан с периодом активного роста продуцента. Интенсификация накопления биомассы в 1,2 раза и увеличение активности лектинов в 4 раза достигается добавлением в среду культивирования аспарагиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл.

Впервые выявлено, что предварительная обработка 1 кг семян зерновых и бобовых культур (пшеница, горох) лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в дозировке 10 мл (10 мкг/мл) увеличивает на 13-14 % энергию прорастания и накопление в 3-4 раза растительной биомассы, повышает в 1,3-1,4 раза индуцированную устойчивость растений к фитопатогенам.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обобщены данные научной литературы по характеристике грибов рода *Alternaria* в качестве продуцентов биологически активных соединений и условий, необходимых для накопления биомассы и синтеза лектинов. Рассмотрены вопросы функциональной активности лектинов микромицетов.

Обосновано использование нового, депонированного штамма *A. alternata* ВКПМ F-2039 в качестве продуцента биологически активных лектинов для народного хозяйства.

Доказана эффективность применения лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 в растениеводстве в качестве биопрепарата, стимулирующего рост и повышающего устойчивость зерновых и бобовых культур (пшеница и горох) к действию фитопатогенов. Рекомендована дозировка биопрепарата для предпосевной обработки семян зерновых и бобовых культур 10 мл (содержание лектинов 10 мкг/мл), на 1 кг семян.

Разработана биотехнология культивирования гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 для получения биопрепарата Барьер. Полученный биопрепарат не токсичен и имеет низкий уровень мутагенной активности (МИ 1,8), поэтому может быть

рекомендован для использования в растениеводстве. Препарат активен в диапазоне 5-50 °С и pH 6,5-8,5, устойчив к хлориду натрия (0,5-1,0 %) и ионам металлов (1,25-20 мМ). Положительное действие препарата Барьер, на горох сорта «Усатый кормовой», проверено в полевых условиях.

Разработаны технические условия на препарат Барьер в качестве ростостимулирующего и фунгицидного средства для растениеводства (18.03.2026 г., Приложение Б).

Основные результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КНИТУ» при подготовке магистров, обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология» (акт от 06.06.2026 г., Приложение В).

Методология и методы исследования. В диссертации применены общенаучные методы, в том числе теоретические и эмпирические. Выделение и идентификацию новых штаммов грибов рода *Alternaria*, их культивирование, определение ростовых показателей, микро- и макроморфологических признаков, количества биомассы и титр активности лектинов проводили с использованием стандартных методов, применяемых в микробиологии, микологии и биотехнологии.

Количественное определение содержания лектинов определяли методом жидкостной хроматографии, белков и пероксидазную активность – методом спектрофотометрии. Ростстимулирующую и фунгицидную активность оценивали визуально и с помощью измерительных приборов. Мутагенную активность и токсичность препарата проверяли с помощью бактериального метода оценки мутагенного потенциала химических соединений.

Положения, выносимые на защиту:

- получение новых изолятов грибов рода *Alternaria* и выявление наиболее активного продуцента лектинов;
- обоснование выбора *A. alternata* ВКПМ F-2039 как перспективного

продуцента лектинов, выбор состава питательной среды, стимулирующих добавок для его жидкофазного культивирования;

- результаты испытаний ростостимулирующих и фунгицидных свойств лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039;

- разработка биотехнологии получения препарата на основе лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 – Барьер для его применения в растениеводстве.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена применением современных биотехнологических способов, микробиологических и физико-химических методов анализа, подтверждается их воспроизводимостью. Для обработки экспериментальных данных использована программа «*Statistica 10.0*». Полученные результаты не противоречат данным литературы.

Результаты работы были доложены и обсуждены на: XVII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2021); 79-ой Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальной, прикладной медицины» (Самарканд, 2025); Конгрессе с международным участием «Эпидемиология – 2025» (Москва, 2025); 18th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas (New-York, 2026).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России по специальности, 2 статьи в других рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, 1 статья в журнале, индексируемой в зарубежных базах данных (Google Scholar, CrossRef), а также 4 публикации в сборниках материалов и тезисов Международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключения, списка литературы, 3 приложений. Работа изложена на 172

страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 39 таблиц, и 219 литературных источников, в т.ч. 155 – зарубежных авторов.

Личный вклад автора состоит в постановке целей, задач и проведение экспериментов, обработке, интерпретации и обобщении результатов, в формулировке выводов, написании и оформлении статей, тезисов докладов, диссертационной работы.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ИППБТ КНИТУ, профессору кафедры пищевой биотехнологии, научному руководителю д.х.н., проф. Сысоевой М.А., доценту кафедры пищевой биотехнологии, к.х.н. Хабибрахмановой В.Р. за консультации по экономическим расчетам и оформлению работы. Сотрудникам ИФМиБ КФУ, профессору кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, д.б.н., профессор Багаевой Т.В. за консультации в постановке и проведении экспериментов; доценту кафедры микробиологии, к.б.н. Карамовой Н.С. за помощь в исследовании мутагенной активности образцов, доценту кафедры ботаники и физиологии растений, к.б.н. Якушенко Т.П. за консультации в проведении полевых испытаний. ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН заведующему лабораторией молекулярно-генетических и микробиологических методов, отдела перспективных исследований, д.б.н. Валидову Ш.З. и лаборанту-исследователю Фролову М.Д. за помощь в проведении секвенирования по методу Сэнгера.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биотехнологический потенциал грибов рода *Alternaria*

Грибы рода *Alternaria* относятся к семейству Pleosporaceae (Pleosporales, Dothideomycetes и Ascomycota). Для представителей этого рода характерно образование крупных, темно окрашенных многоклеточных конидий с поперечными и продольными перегородками, что используется как один из основных диагностических признаков. В современной системе род *Alternaria* включает более 350 видов грибов, которые, опираясь на морфологические и молекулярно-филогенетические критерии, объединяют в группы мелко- и крупноспоровых форм с выделением нескольких секций [1,2].

Биологические стратегии представителей рода *Alternaria* достаточно разнообразны. Значительная часть видов выступает в роли сапротрофов, разлагающих растительные остатки и другие органические субстраты и тем самым участвующих в минерализации органического вещества. В то же время среди грибов рода *Alternaria* описано много фитопатогенных видов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных и декоративных культур, а отдельные виды относят к числу наиболее вредоносных патогенов [3-6]. Некоторые представители микромицетов рода *Alternaria* охарактеризованы как эндофиты [7-9].

Заболевания растений, вызываемые этими грибами, имеют название альтернариозы. Оно проявляется в виде сухой пятнистости на листьях, стеблях, которую не сложно обнаружить и распознать. Плотные, коричневые или чёрные пятна с чёткими границами и различной формы появляются на зелёных листьях. Постепенно листья на участках, поражённых грибом, высыхают и покрываются бархатным оливкового цвета налётом – спорами грибка.

На плодовых культурах альтернариоз распространяется путём проникновения грибка в завязь плода. В центре поражённого созревшего плода

появляется плесень и гниль.

На цветочных растениях альтернариоз проявляется маленькими бурыми или чёрными пятнышками по всей надземной части. Грибки-возбудители распространяются при помощи семян или остатков растений, а переносятся насекомыми. Зимой споры не погибают, но и не развиваются. С наступлением благоприятных условий, когда воздух прогреется до 23-27 °С, грибок начинает активно развиваться [10,11].

Одной из причин повышенного интереса к роду *Alternaria* является способность его представителей синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов. За последние десятилетия описано более 300 низкомолекулярных соединений этой природы, относящихся к различным классам природных веществ. Показано, что вторичные метаболиты *Alternaria* могут проявлять антимикробную, антиоксидантную, противоопухолевую активность, а также активность в отношении ВИЧ инфекций, метаболических нарушений, в том числе диабета. Тем самым грибы рода *Alternaria* рассматриваются как перспективный источник биологически активных соединений [2,12].

Микромицеты рода *Alternaria* способны продуцировать микотоксины, специфичные и неспецифичные фитотоксины [13]. С точки зрения прикладной биотехнологии такие соединения рассматриваются двояко. С одной стороны, они могут служить прототипами для создания новых пестицидов и фармакологически активных веществ [14]. С другой стороны, наличие токсинов в грибной биомассе и конидиях повышает риск контаминации кормов и пищевого сырья, что обуславливает опасность отравлений человека и животных [15].

Патогенные виды микромицетов рода *Alternaria* могут наносить вред не только сельскохозяйственной продукции, поражая растения и животных, но и здоровью человека [16,17].

Микотоксины грибов рода Alternaria. Среди микотоксинов *Alternaria*

наибольшее практическое значение имеют производные дибензопиранона – альтернариол (АОЛ), его метиловый эфир (АМЭ), а также тентоксин (ТТ), тенуазоновая кислота (ТеК) и альтертоксины I-III. Эти соединения могут синтезироваться как крупноспоровыми видами (*A. solani*, *A. porri*, *A. dauci* и др.), так и мелкоспоровыми (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* и др.) [18-21]. ТеК, относящаяся к производным тетрамовой кислоты, а также периленхиноновые альтертоксины I-III в большей степени характерны именно для мелкоспоровых форм *Alternaria* [22,23].

Острая токсичность среди перечисленных метаболитов наиболее выражена у ТеК. Для АОЛ, его производных и альтертоксинов более существенными считаются отдалённые эффекты – генотоксичность, канцерогенный и мутагенный потенциал [24]. Показано, что АОЛ и АМЭ в концентрации около 10 мкМ способны подавлять индукцию клеточного иммунитета в культурах макрофагов мыши и в клетках эпителия лёгких человека [25].

Минорные альтертоксины I-III также проявляют генотоксические и мутагенные свойства [26], причём альтертоксин III в тесте Эймса на *Salmonella typhimurium* характеризовался мутагенной активностью, лишь на порядок уступающей афлатоксину В1 [27].

Несмотря на токсигенный потенциал, нормативное регулирование содержания микотоксинов *Alternaria* в пищевых продуктах и кормах до настоящего времени практически отсутствует как в России, так и в большинстве других стран. При этом имеются данные, что ТеК достаточно быстро выводится из организма с мочой, тогда как АОЛ в основном экскретируется с фекальными массами и мочой. Кроме того, АОЛ при экспериментальных дозах не проявлял выраженной системной генотоксичности [27-29].

Фитотоксины грибов рода Alternaria. Грибы рода *Alternaria* относятся к некротрофным патогенам, для которых характерно образование фитотоксинов (ФТ). Широкий круг растений из различных семейств чувствителен к

большинству ФТ грибов рода *Alternaria*, что свидетельствует о их неспецифичности [30-32].

Наряду с этим выделяют и хозяин-специфические фитотоксины (ХСТ), действующие избирательно на ограниченный круг сортов или видов растений. Для многих ХСТ показано, что они нарушают функции мембран, приводят к потере мембранного потенциала митохондрий, утечке ионов калия и кофактора НАД⁺, что в конечном итоге инициирует некроз тканей чувствительных растений.

Гены биосинтеза ХСТ у *A. alternata* часто локализованы на дополнительных (условно-диспансательных) хромосомах, отсутствие которых не препятствует базовому росту гриба, но влияет на его патогенность [33]. Часть фитотоксинов *Alternaria* обладает помимо фитотоксического ещё и антимикробным, инсектицидным или цитотоксическим действием. Так, из культуральной жидкости грибов этого рода был выделен антрахиноновый пигмент альтерсоланол А, подавлявший рост проростков салата и лука-батуна (*Allium fistulosum*) за счёт ингибирования клеточного дыхания [34]. Подобные соединения рассматриваются как удобные модели для поиска мишеней действия и разработки новых биопрепаратов.

Фитотоксины *Alternaria* могут использоваться и как селективные факторы при селекции устойчивых растений [2, 34]. Известны подходы, при которых токсины гриба *A. solani* включали в состав питательных сред, что позволяло отбирать формы томата и картофеля с повышенной устойчивостью к альтернариозу (патент РФ № 2066347) [35]. Тентоксин применяли в биотехнологии растений как чувствительный маркер жизнеспособности и функционального состояния хлоропластов у гибридов *Nicotiana* spp. [36].

Грибы рода Alternaria – продуценты микогербицидов. Интерес к *Alternaria* как к продуценту микогербицидов обусловлен необходимостью уменьшения объёмов применения химических гербицидов, особенно в системах органического земледелия [37-39].

Фитотоксичные вторичные метаболиты – как растительного происхождения (аллелопатия), так и микробного (факторы патогенности и колонизации) – рассматриваются как основа биологических гербицидов [40-42]. Среди микроорганизмов-продуцентов фитотоксинов особое внимание уделяется грибам рода *Alternaria* [43]. Ряд штаммов, поражающих сорные растения, предложен в качестве основ биогербицидов и даже описан в патентной литературе, однако широкое внедрение таких средств в сельское хозяйство пока не состоялось [44]. Основные препятствия связаны с нестабильностью эффекта в полевых условиях, технологическими сложностями масштабного получения биомассы при твёрдофазном культивировании и в высушивании конидий, что традиционно используется при производстве грибных биопестицидов [45].

Тем не менее, есть примеры успешных полевых испытаний гербицидных препаратов на основе тенуазоновой кислоты, синтезируемой *Alternaria* spp., против сорняков хлопчатника и табака. В опытной композиции присутствовал также адъювант (полиоксиэтиленовый эфир жирных спиртов и лаурокарпам в соотношении 1:3), обеспечивающий эффективное нанесение 0,4 % раствора активного вещества [46].

Среди коммерчески реализованных продуктов наиболее известен микогербицид Casst на основе конидий *A. cassiae*, применяемый для контроля растений Сенной туполистной (*Senna obtusifolia*) и Кроталарии нарядной (*Crotalaria spectabilis*) [2].

Разработаны также композиции против других сорняков. Так, смесь конидий *Alternaria* sp. и *Fusarium tricinctum* в 0,05 % растворе Твин-20 показала высокую эффективность (до 90 % снижения численности) против повилики (*Cuscuta* spp.) на плантациях клюквы [47].

Перспективными изолятами для разработки биогербицидов против, чертополоха мелкоголовчатого (*Carduus pycnocephalus*), щирицы запрокинутой (*Amaranthus retroflexus*), лантаны сводчатой (*Lantana camara*), ежовника

(*Echinochloa* spp.), водного гиацинта (*Eichhornia crassipes*), и сфеноклеи цейлонской (*Sphenoclea zeylanica*), были признаны микромицеты вида *A. alternata* [48].

Из культуральных жидкостей отдельных изолятов выделяли ТеК и другие фитотоксины, предлагаемые в качестве компонентов гербицидных композиций либо маркеров для отбора наиболее патогенных штаммов, например ТеК-содержащий фильтрат *A. alternata* LC508 предложен для контроля *Lantana camara* [49].

Интерес представляют и комплексные подходы, сочетающие методы молекулярного моделирования и классической гербицидологии. Используя модель взаимодействия ТеК с белком D1 фотосистемы II арабидопсиса, были спроектированы производные 3-ацил-5-алкилтетрамовой кислоты с повышенной аффинностью к мишени (D6, D13, D27). Биотестирование показало, что отдельные из этих соединений (D6, D13) превосходили по гербицидной активности исходную ТеК [50-53].

В разное время в качестве прототипов будущих химических гербицидов рассматривались AAL-токсин, тентоксин, макулозин, ТеК и другие фитотоксины *Alternaria*.

AAL-токсин демонстрировал высокую активность против ряда сорняков, однако выявленная токсичность для млекопитающих существенно ограничила его прикладной потенциал [54].

ТТ, циклический тетрапептид, образуется не только *A. alternata*, *A. linicola*, *A. porri*, но и некоторыми другими микромицетами. Он проявляет широкий спектр фитотоксического действия в микромолярных концентрациях и по совокупности свойств выглядит перспективным кандидатом на роль основы нового гербицида.

Однако есть определенная сложность в получении перечисленных выше фитотоксинов, и связана она с тем, что в чистой культуре данные токсины образуются более чем через 1 месяц культивирования микромицетов. Примером может служить сложность получения нового гербицида на основе токсина ТТ.

Выход биомассы был низким как при культивировании гриба-продуцента *A. alternata* (макс. 90 мг/л), так и при многостадийном химическом синтезе [55].

В качестве возможных решений рассматриваются вопросы оптимизации состава питательной среды и условий культивирования продуцентов, а также генетическая модификация штаммов.

Другой пример, минорный метаболит *A. alternata*, пептид лей-про-лей-фен, проявлял активность как на надколотых листовых дисках, так и на целых растениях и был рекомендован как гербицид [55].

Перспективы для создания новых гербицидов связывают и с другими метаболитами *Alternaria*. Например, пептид лей-про-лей-фен, выделенный из *A. alternata*, проявлял фитотоксичность как на надрезанных листовых дисках, так и на целых растениях, что позволило рассматривать его в качестве кандидата на роль гербицидного вещества [55].

Штамм гриба *Alternaria sonchi* Г-52, обладающий гербицидной активностью против осота полевого, в настоящее время признан как перспективный препарат [56]. При этом для ряда штаммов, в частности *A. alternata*, важно учитывать накопление АОЛ в конидиях гриба, в оболочке которых обнаружены аллергенные белки типа Alt al-al. Информация о токсигенных и аллергенных свойствах многих других возбудителей альтернариозов пока ограничена [57].

Несмотря на обозначенные аспекты, потенциальные возможности данного рода грибов очень широки и их продолжают изучать в качестве возможных продуцентов биологически активных веществ.

Грибы рода Alternaria – продуценты инсектицидов. Токсины, вырабатываемые грибами рода *Alternaria*, рассматриваются также и в качестве инсектицидных препаратов [58-59].

ТеК, например, проявляла ларвицидную активность по отношению к личинкам *Lucilia sericata* (ЛД около 120 мкг/мл) и при этом была малоэффективна против ряда других тест-объектов (*Drosophila melanogaster*, *Sitophilus granarius*,

Aphis fabae, *Tetranychus urticae*). Обработка листьев *Rosa chinensis* нефитотоксичными концентрациями ТеК вызывала усиление синтеза защитных метаболитов и гибель тли *Macrosiphum rosivorum*.

Из культур *A. alternata* выделяли соединения с выраженной ацетилхолинэстераза-ингибирующей активностью, например, альтенуен, который при внесении в корм на уровне 50 мг/мл приводил к гибели более 70 % гусениц *Spodoptera litura* [60].

Для некоторых грибов филлосферы и почвенных гипокреинных микромицетов установлена инсектицидная, акарицидная и цитотоксическая активность их экстрактов [61].

Грибы рода Alternaria – продуценты антимикробных метаболитов. Одними из активных продуцентов антимикробных соединений могут стать виды *Alternaria*, которые производят широкий спектр вторичных метаболитов. Это, прежде всего, грибы рода *Alternaria*, продуцирующие токсические соединения фунгицидного действия. Так, из культуры эндофита виноградной лозы, идентифицированного как *A. alternata*, были выделены три соединения из группы дикетопиперазинов. Данные соединения ингибировали спороношение возбудителя ложной мучнистой росы винограда *Plasmopara viticola* и не оказывали фитотоксического действия на его листья. Продуцирующий эти дикетопиперазины штамм *A. alternata* и его метаболиты были запатентованы как основа для фунгицидного препарата [62].

Экстракты изолятов вида *A. alternata* из растений *Suaeda martiana* и *Suaeda monoica*, а также изоляты *A. solani* из *Heptacodium miconioides*, обладали сильным бифунгицидным действием. Мощная противогрибковая активность наблюдалась под действием экстракта *Alternaria spp.*, выделенного из *Clerodendrum inerme* [63,64]. Кроме этого, были получены активные противогрибковые соединения Фишексантон и гельволовая кислота, продуцируемые микромицетами рода *Alternaria* [65].

Антимикробное действие микромицетов рода *Alternaria* отмечается в работах ряда авторов. Установлено, что для микромицетов рода *Alternaria*, в том числе вида *A. alternata*, характерно образование соединений против широкого спектра патогенных бактерий. Отмечена антимикробная активность, которую в минимальных ингибирующих концентрациях, проявлял брассициколин А, выделенный из *A. brassicicola* в отношении *S. aureus* и *B. subtilis*. Сильную антимикробную активность относительно бактерий и грибов проявляли дибензо- α -пироны, альтерсин, продуцируемые микромицетами рода *Alternaria* [65-67].

Грибы рода Alternaria – продуценты ферментов. Способность грибов рода *Alternaria* использовать широкое разнообразие субстратов для своего метаболизма, связано, прежде всего, с их способностью синтезировать ферменты. Огромный комплекс ферментов обнаружен у сапрофитных видов микромицетов рода *Alternaria*. Среди них хорошо изучены сериновые пептидазы и металлопептидазы [68]. Данные ферменты грибов рода *Alternaria* играют важную роль в их биологии, включая питание, патогенность и регуляцию роста и развития. В отдельных видах найдены активные трипсино- и субтилизиновые протеиназы [68]. Полигалактуроназа вырабатывается некоторыми видами грибов, в том числе и представителями рода *Alternaria*, например, *A. alternata*. Этот фермент ответственен за расщепление пектина, полимера, который является важным компонентом клеточных стенок растений. У грибов рода *Alternaria* полигалактуроназа играет роль в патогенезе, помогая микромицету проникать в ткани растений и вызывать болезни, такие как черная гниль [69].

Сравнительно недавно у микромицетов рода *A. alternata* был обнаружен синтез глюкоамилаз [70]. Разработано производство глюкоамилазы из *A. alternata* при твердофазном культивировании гриба [71].

В поиске лигнин разрушающих ферментов был проведен скрининг нескольких видов микромицетов рода *Alternaria*. Был установлен наиболее перспективный природный изолят – *A. alternata* PDA1, который обладал

мощными лигноцеллюлозолитическими способностями. Была также охарактеризована ферулоилэстеразная активность ферментного экстракта, определены оптимумы pH и температуры (pH 5,0 и 55-60 °C соответственно), определена термическая стабильность и кинетические параметры данных ферментов. Протеомный анализ, полученный с помощью двумерных гелей, позволил идентифицировать и классифицировать 97 белковых пятен из внеклеточного протеома. Большинство идентифицированных белков относились к группе метаболизма углеводов, в частности, к деградации клеточной стенки растений. Также измерялась ферментативная активность идентифицированных белков (β -глюкозидаза, целлобиогидролаза, эндоглюканаза, β -ксилозидаза и ксиланаза) экстракта. Эти результаты подтверждают, что *A. alternata* PDA1 является перспективным продуцентом лигноцеллюлозолитических ферментов [72].

Проведена сравнительная характеристика двух изолятов – *A. alternata* и *A. tenuissima*, по показателям ферментативной активности и патогенности. Исследование охватывало 5 типов гидролитических ферментов, разрушающих клеточную стенку: амилазы, протеазы, пектиназы, фосфатазы и целлюлазы. Оценка проводилась на 5 и 7 дни с использованием индикаторных сред, выявляющих зоны активности, а также при визуальном измерении роста и ферментативного распада. Оба изолята показали средние и средне-высокие уровни ферментативной активности, демонстрируя широкий биохимический потенциал. При сравнении изолятов было установлено, что оба изолята проявляли высокую амилолитическую и низкую фосфатмобилизующую активность [73].

Кроме ферментов некоторые виды *Alternaria spp.* способны синтезировать внеклеточные полимерные вещества, которые способствуют стресс устойчивости растений к засухе. Стресс засухи был смоделирован в гидропонной культуре, при этом корни люцерны (*Medicago sativa* L.) были обработаны различными концентрациями полимеров. Гидропонные растворы с концентрацией полимеров в концентрации 0,25 % и 0,50 % смягчили увядание листьев и увеличили общий

свежий вес растения на 35,8 % и 57,7 % соответственно. Полимеры прикреплялись к корням и могли служить защитой для корневой системы. Обработка полимерами вызвала окислительный стресс и изменила метаболизм растений, что, в свою очередь, увеличило антиоксидантную способность растений [74].

В настоящее время *A. alternata* используется для получения противоопухолевого препарата паклитаксела [75].

1.2 Лектины как биотехнологический продукт с высоким функциональным потенциалом

Лектины представляют собой обширную группу углеводов-связывающих белков и гликопротеинов, играющих ключевую роль в молекулярном распознавании и межклеточных взаимодействиях. Для них характерно наличие некаталитических участков связывания углеводов [76,77].

Лектины, в отличие от ферментов, не изменяют участки связывания углеводов и, в отличие от антител, не индуцируют иммунный ответ [78].

Эти биомолекулы уникальны, поскольку участвуют в разнообразных биологических процессах, включая взаимодействие между организмом-хозяином и патогенами, клеточную адгезию, индукцию апоптоза, они способны проявлять антибактериальную, противогрибковую, противоопухолевую активности [79-81].

Благодаря способности избирательно взаимодействовать с гликоконъюгатами, лектины вовлечены в широкий круг биологических процессов: адгезию и миграцию клеток, взаимодействие патогена и хозяина, индукцию апоптоза, модуляцию врождённого и адаптивного иммунитета. Для многих лектинов показаны антибактериальная, противогрибковая, противоопухолевая и противовирусная активность [79-81]. Эти свойства обусловили их активное использование в иммунологии, клеточной биологии и онкологии как инструментов для типирования клеток, изучения рецепторных

систем и сигнальных путей, а также в прикладной биотехнологии – для осаждения, очистки и фракционирования биополимеров и водных растворов. Одновременно обсуждаются возможности применения лектинов в медицине и сельском хозяйстве как действующих биопрепаратов [82,83].

Исторически интерес к лектинам возник более века назад. В 1888 году Г. Штильмарк выделил из семян клещевины обыкновенной (*Ricinus communis*) белок, вызывавший склеивание эритроцитов (гемагглютинацию), который позднее получил название рицина [84].

Вскоре были описаны и токсичные агглютинины грибного происхождения, в частности у *Amanita phalloides* (1891 г.), что стало отправной точкой для исследований лектинов в разных таксономических группах [85].

С развитием методов биохимического анализа и молекулярной биологии стало ясно, что лектины обнаруживаются практически во всех царствах живой природы – у вирусов, бактерий, грибов, растений и животных, включая человека [86-89].

Структурные особенности лектинов. Структурная организация лектинов достаточно вариабельна. Большинство хорошо изученных представителей относятся к гликопротеинам и состоят из двух и более субъединиц, при этом молекулярная масса отдельных мономеров и олигомеров может изменяться от 10 до 400 кДа [90,91].

Белковая часть, часто обогащённая серином и треонином, формирует углевод-связывающий карман и взаимодействует с лигандом в основном за счёт системы водородных связей и гидрофобных контактов. Углеводный компонент, составляющий примерно от 3 до 80 % массы молекулы, представлен различными моносахаридами и их производными – глюкозой, маннозой, галактозой, фукозой, N-ацетилглюкозамином [92].

Для многих лектинов высших организмов характерна металло-зависимость: в их структуру входят ионы двухвалентных металлов (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}

и Co^{2+}), которые стабилизируют конфигурацию углеводов-связывающего участка и необходимы для реализации полной биологической активности [93,94]. Однако для лектинов микроскопических грибов наличие ионов металлов не всегда характерно. Многие виды лектинов микроскопических грибов проявляют свою активность и без участия ионов металлов [95].

Число сайтов связывания углеводов на одной молекуле лектина может варьировать от двух до двенадцати и зависит как от природы белка, так и от степени его олигомеризации. Связывание с олигосахаридными детерминантами на клеточной поверхности и в составе внеклеточного матрикса позволяет лектинам выполнять структурные функции, регулировать транспорт гликоконъюгатов и выступать в роли рецепторных маркеров, участвующих в системах распознавания «свой – чужой» [96].

Классификация лектинов. Для систематизации разнообразия лектинов предложено несколько подходов к их классификации. Их подразделяют по источнику (растительные, животные, микробные), по молекулярной организации, по соотношению белковой и углеводной частей, по валентности и по функциональным особенностям.

В рамках структурного подхода выделяют три больших класса: простые, мозаичные (многодоменные) и лектины макромолекулярных сборок. Простые лектины – относительно небольшие белки или олигомеры с одним углеводов-связывающим участком на субъединицу, обычно с молекулярной массой менее 40 кДа; сюда относятся большинство растительных лектинов и значительная часть галектинов млекопитающих – β -галактозид-специфичных лектинов животных [97].

Мозаичные лектины содержат несколько различных белковых доменов, причём углеводов-связывающий участок имеется лишь в части из них. К этому классу относят, например, вирусные гемагглютинины и некоторые С-, Р- и I-типы лектинов животных.

Бактериальные лектины часто представлены фимбриями или пилями – нитевидными структурами, сформированными из спирально упакованных субъединиц (пилинов), где углевод-связывающие домены локализованы в терминальных или боковых элементах [97].

С практической точки зрения важна классификация, основанная на специфичности к моносахаридам. В одной из наиболее известных систем, предложенной Слифкиным и Дойлом (1990 г.), лектины разделены на пять групп по предпочтительному связыванию D-маннозы и D-глюкозы (группа 1), D-галактозы и N-ацетил-D-галактозамина (группа 2), N-ацетил-D-глюкозамина (группа 3), L-фукозы (группа 4) и N-ацетилнейраминовой кислоты (группа 5) [98]. Основным критерием здесь выступает тонкая специфичность к определённым углеводным детерминантам.

В другой широко используемой классификации деление лектинов опирается на структурные особенности углевод-связывающих доменов и связанную с ними биологическую роль. В этой системе выделяют М-тип (гликозидгидролазы, специфичные к маннозе, локализованные в аппарате Гольджи и ЭПР), L-тип (лектиноподобные белки с различной специфичностью, преимущественно ЭПР-локализованные), Р-тип (рецепторы маннозо-6-фосфата), I-тип (иммуноглобулиноподобные, часто сиаловаяците-специфичные), С-тип (кальций-зависимые лектины с широким спектром специфичности), **R-тип** (включают токсичные растительные лектины (например, рицин)); **S-тип** (галектины, не требующие ионов металлов); **Калнексины** (специфичны к высокоманнозным N-гликанам).

Данная классификация была в 1998 г. предложена исследователями Дрикамером и Тейлором [99].

Лектины микроскопических грибов. Микроскопические грибы продуцируют разнообразные лектины, которые обнаруживаются в различных структурах, преимущественно в мицелии и конидиях [100].

Образование внутриклеточных мицелиальных лектинов установлено для таких видов, как *P. proteolyticum* [101], *F. sambucinum* [102], *A. niger* [103], *A. fumigates* [104, 105] и других.

Некоторые виды микроскопических грибов могут синтезировать и внеклеточные лектины. Наличие лектинов – агглютининов в культуральной жидкости и на поверхности клеток мицелия показано для штаммов *R. bataticola* [106], *P. sojae* [107], *F. solani* [108], *S. graminicola* [109].

Молекулярная масса грибных лектинов варьируется от 15 до 90 кДа, причем большинство имеют массу в диапазоне 23-36 кДа. По структуре они преимущественно представляют собой димеры, стабилизированные нековалентными взаимодействиями, хотя известны исключения, когда структуры формируются с помощью дисульфидных связей.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей и функциональных характеристик было предложено, структурно охарактеризованные углеводов-связывающие лектины грибов, распределять по нескольким семействам [110]:

- **β -propeller-подобные:** *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*;
- **Актино-подобные:** *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*;
- **Циановирин-подобные:** *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa*;
- **β -трилистник-подобные:** *Marasmius oreades*, *Boletus edulis*;
- **Галектин-подобные:** *Rhizoctonia solani*;
- **Адгезин-подобные:** *Ashbya gossipii*;
- **Иммуномодулирующие:** *Nectria haematococca*.

Интенсивное изучение структуры и функций грибных лектинов продолжается, открывая, тем самым, новые перспективы их практического применения в медицине и биотехнологии [83].

Разнообразные биологические свойства, включая антибактериальную, противогрибковую, инсектицидную и противовирусную активность, которая была показана ранее для лектинов растений, теперь установлена и для грибов [111-113].

Лектины микромицетов были описаны как химиотерапевтические агенты, митогены и средства доставки лекарств к необходимым мишеням [114-116].

Преимуществом низших грибов в данном направлении является их генетическое разнообразие, быстрый рост и практически неограниченная биосинтетическая деятельность, включая активный синтез лектинов, обладающих разнообразными физико-химическими свойствами. Установлено, что лектины микромицетов могут функционировать в широком диапазоне значений температур и pH, иметь разную зависимость от ионов металлов, обладать специфичностью к взаимодействию с различными углеводами. Так, лектины грибов *F. solani* и *R. stolonifer* сохраняли свою активность и при температуре 70-80 °С, а лектины *A. sparsus* – до 100 °С. При этом лектин *A. sparsus* имел высокую стабильность при значениях pH от 1,5-12,5. Однако есть лектины микромицетов того же рода, например, *A. nidulans*, которые были очень чувствительны к температуре и pH реакционной смеси [117,118].

Лектины микромицетов по-разному реагируют на присутствие металлов в реакционной среде. Многие из них, как отмечалось выше, не требуют ионов металлов для проявления своей активности, другие проявляют свою активность только в их присутствии [96].

Значимое различие лектинов микромицетов связано и с их взаимодействием с углеводами. Они способны к взаимодействию, как с простыми сахарами, так и с гликопротеинами [119].

Кинетика образования лектинов грибов связана с периодом активного роста клеток мицелия. Установлено, что микромицеты рода *Fusarium* синтезируют лектины в конце экспоненциальной фазы роста [120,121].

Функции лектинов микромицетов до конца не изучены, но отмечается значимая их роль в различных процессах метаболизма клеток. Одна из таких – роль лектинов в процессах патогенеза.

1.3 Роль лектинов в процессах патогенеза и устойчивости растений

Представления о лектинах микромицетов как о специфических молекулах распознавания и эффекторах грибкового патогенеза значительно расширились за последние десятилетия [86, 122].

Показано, что углевод-связывающие белки участвуют как в формировании клеточной стенки самих грибов, так и в первых этапах контакта с клетками хозяина. Так, глюкозамин- и N-ацетилглюкозамин-связывающие лектины *Conidiobolus obscurus* вовлечены в построение фибриллярных полимеров клеточной стенки, а внеклеточный лектин *Neurospora sitophila* играет заметную роль не только в биосинтезе клеточной стенки, но и дифференцировке мицелия. Для лектинов *N. sitophila* и *Conidiobolus lamprauges* показано связывание с β -1,3-глюканом клеточной стенки, что указывает на их участие в её созревании и remodelировании. Конидиальные лектины *Penicillium marneffeii* и *Aspergillus fumigatus* характеризованы как гликопротеины, опосредующие прикрепление к компонентам внеклеточного матрикса и структурам эпителиальных клеток хозяина через концевые остатки сиаловой кислоты углеводных цепей [96, 102].

В последнее время возродился интерес к изучению роли лектинов в модуляции различных биологических реакций в растениях. Биотические и абиотические стрессы оказывают негативное влияние на развитие, рост и продуктивность растений. В течение многих лет исследователи пытались понять, как растения реагируют на стресс, и разработать стратегии для получения стрессоустойчивых культур. Было продемонстрировано, что молекулярные сети, включающие в себя множество генов и функциональных белков, играют ключевую роль в формировании реакций на различные стрессовые факторы. Одним из таких факторов могут быть лектины фитопатогенов.

На сегодняшний день известно значительное число растительных лектинов, даны их функциональные характеристики. Однако их роль в устойчивости к

стрессу ещё предстоит всесторонне проанализировать. Тем не менее, уже сейчас можно с уверенностью заявить о значимой роли лектинов в данном процессе. Показано, что в фотосинтезирующих организмах лектины локализируются в различных компартментах, что согласуется со множеством разнообразных функций, выполняемых лектинами, например, в передаче сигналов клетками, связанными с ростом и развитием, а также с реакцией растений на биотические, симбиотические и абиотические стимулы. Показано участие лектинов в решении проблемы накопления растворимых углеводов путем их связывания и придания им осмотической инертности. При этом сахара остаются легкодоступными и высвобождаются сразу при изменении осмотического равновесия, что в свою очередь происходит при изменении внешних условий среды [123].

Способность лектинов узнавать сложные углеводные детерминанты делает их ключевыми участниками ранних этапов взаимодействия «растение–патоген». Именно раннее распознавание микроорганизма как патогена определяет скорость и полноту включения защитных реакций, и формирование устойчивости. Недавние исследования на микроскопических грибах продемонстрировали, что лектины, локализованные на поверхности мицелия, играют существенную роль в межгрибном антагонизме и микопаразитизме: они участвуют в распознавании клеток растения-хозяина фитопатогенами, а также в контактах между грибами-мишенями и микопаразитами [124,125].

Показательно взаимодействие *Rhizoctonia solani* и грибов рода *Trichoderma*. Установлено, что молекулярное распознавание клеток является одной из первых стадий микопаразитического процесса. У *R. solani* был выделен поверхностный лектин из гифа, вызывающий гемагглютинацию эритроцитов первой группы крови; эта реакция подавлялась галактозой и фукозой. Такой профиль специфичности позволил предположить, что агглютинин *R. solani* функционирует как рецептор, распознающий галактозу и фукозу в составе углеводных детерминант на поверхности клеток потенциального хозяина. Далее было

показано, что клеточная стенка микромицетов *Trichoderma* действительно содержит остатки галактозы и фукозы, с которыми и взаимодействует лектин *R. solani* [124,125].

Подобные механизмы продемонстрированы и для микопаразитов *T. harzianum* и *T. viride* в отношении возбудителя пепельной гнили *Macrophomina phaseolina*. Детальное изучение показало, что прикрепление микопаразитов к поверхности фитопатогена опосредовано лектин-углеводными взаимодействиями. Лектины *T. harzianum* и *T. viride* представляют собой гликопротеины с молекулярными массами 55 и 52 кДа и специфичностью к D-глюкозе, D-галактозе, D-фукозе, N-ацетил-D-галактозамину, а также к сложным гликопротеинам (фетуину, муцину). Предполагается, что перечисленные сахара присутствуют в составе гликоконъюгатов на клеточной оболочке *M. phaseolina*, а лектины *Trichoderma* обеспечивают специфическое распознавание этих детерминант, то есть своего рода «узнавание жертвы хищником» [126].

На основании этих и других данных лектины рассматриваются как важные элементы механизма микопаразитизма. Первичный контакт и адгезия микопаразита к клеткам гриба-хозяина во многом определяются поверхностными лектинами мицелия. В ответ на распознавание активируются системы с обеих сторон: у микопаразита формируются инфекционные структуры и индуцируется синтез литических ферментов (хитиназ, глюканаз, протеиназ), разрушающих клеточную стенку хозяина, а у гриба-мишени запускаются защитные реакции. Итогом противоборства может стать проникновение микопаразита в клетки хозяина и гибель последнего.

Функции лектинов и защита растений от патогенов. В более широком смысле функции лектинов и их участие в защите растений от патогенов можно сгруппировать по нескольким направлениям. Лектины могут выполнять:

1) структурные функции (входить в состав мембранных гликопротеинов, участвовать в упаковке запасных гликопротеинов, способствовать

«заякориванию» ферментов и формированию ферментных комплексов);

2) транспортные функции (участвовать в перемещении белковых субъединиц, моно- и полисахаридов, обсуждается возможная роль флоэмных лектинов в транспорте вирионов и других РНК);

3) регуляторные функции (модулировать активность ферментов-гликопротеинов и ферментов-лектинов, блокировать определённые олигосахаридные фрагменты; предполагается участие в регуляции цитоскелета);

4) информационные функции (распознавание и иммобилизация патогенов, элиситоров и сигнальных молекул).

Все эти функции в той или иной степени опосредовано связаны с механизмами защиты растений, поэтому защитной роли лектинов посвящён значительный массив публикаций [127-130].

Примером защитной функции может служить новый цитоплазматический, однодоменный лектин, выделенный из плодовых тел дикариотических грибов, проявивший токсичность в отношении различных паразитов и хищников. Данный лектин, обозначенный как MrL, был клонирован и экспрессирован из *M. procera*. Специфическое распределение MrL в тканях ножки и шляпки плодовых тел и его токсичность для нематоды *Caenorhabditis elegans* показали, что MrL защищает плодовые тела от хищников и паразитов [131].

Фунгистатические и инсектицидные свойства лектинов. Фунгистатические и инсектицидные эффекты лектинов описаны главным образом для фитолектинов, но аналогичные свойства выявлены и у грибных белков [132,133].

Хитин-связывающие лектины из семейства агглютининов зародышей пшеницы (АЗП) считаются одним из классических примеров. Высокоочищенный препарат АЗП, не обладающий собственной хитиназной активностью, предотвращал инфицирование срезов клубней картофеля грибами *F. graminearum* и *F. oxysporum*, вызывал морфологические изменения и лизис клеточных стенок, растущих гиф грибов [134].

Механизм противогрибного действия лектинов часто связывают с перекрёстным связыванием хитина и других полисахаридов стенки в зонах активного роста гиф, преимущественно в апексе. Поскольку в более зрелых участках стенки хитин экранирован гликанами, доступность лигандов для лектина максимальна именно в растущем апексе, что приводит к искажению морфогенеза и нарушению целостности клеток [135,136]. Показано, что АЗП избирательно связывается с ростковыми трубками *Helminthosporium sativum* (*Bipolaris sorokiniana*), не влияя на непроросшие споры, но вызывая лизис гиф после прорастания. Экранирование лектин-связывающих рецепторов на поверхности споры рассматривается как один из защитных механизмов патогена.

Подобные эффекты описаны и для других лектинов. Лектин крапивы ингибировал прорастание спор *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride*, *Colletotrichum lindemuthianum* и рост гиф микоризного гриба *Glomus mosseae* на определённых стадиях развития [137].

Хитин-связывающий лектин табака, индуцируемый вирусом табачной мозаики, подавлял рост *T. viride* и *F. solani*; при совместном действии с хитиназами и β -глюканазами наблюдался выраженный синергизм антифунгального эффекта [138].

Белок *Streptomyces tendae*, связывающий хитин и не относящийся к растительным лектинам с гевеиновым доменом, также демонстрировал противогрибковую активность [139].

Фунгистатическое действие зарегистрировано у галактозоспецифического лектина из корней *Astragalus mongholicus* и у маннозо-/хитин-специфического лектина орхидей [140,141].

Конканавалин А избирательно ингибировал образование аппрессорий *Magnaporthe oryzae* при воздействии в первые часы после прорастания, не влияя на адгезию к искусственной поверхности [142].

Фунгистатическая функция была обнаружена у фитолектина *Bauhinia*

variegata против фитопатогена *Bipolaris oryzae* [143]. Лектин из Баухинии пестрой (*Bauhinia variegata*, BvL) обладал многочисленными биологическими свойствами, в том числе противогрибковыми. В работе изучалось потенциальное действие лектина *B. variegata* против грибка *Bipolaris oryzae*, вызывающего гибель растений на юге Бразилии. Было установлено, что только концентрация лектина 100 мкг/мл успешно подавляла рост мицелия и прорастание спор. Кроме того, анализ флуоресцентной микроскопии продемонстрировал способность лектина связываться со структурами клеточной стенки грибка. Это исследование подчёркивает потенциал лектина семян *B. variegata* в контроле за ростом мицелия гриба, спорообразованием и его прорастанием. Данный метод открывает новые биотехнологические возможности для биологического контроля [143].

Очищенные лектины, полученные из бобов фава, проявляли противогрибковую активность против *Candida albicans*. С помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), была продемонстрирована агглютинация и слипание клеток дрожжей, подвергшихся воздействию данных лектинов [144].

Кроме лектинов растений фунгистатическая функция была обнаружена и у лектинов микромицетов. Так, были получены лектины микромицетов рода *Fusarium solani*, которые проявляли способность к защите растений от фузариозов [119].

Было изучено присутствие ряда лектинов в грибах-базидиомицетах *Clitocybe nebularis*. Лектины, связывающие глюкозу, галактозу, сахарозу, лактозу и сефарозу, выделяли из плодовых тел с помощью аффинной хроматографии на сахарах, иммобилизованных сефарозой, или на сефарозе. Инсектицидные свойства выделенных и очищенных лектинов данных грибов были изучены на модельном организме – плодовой мушке (*Drosophila melanogaster*) и колорадском жуке (*Leptinotarsa decemlineata*). Биотестирование с использованием колорадского жука показало, что экстракт *C. nebularis* обладал высокой активностью в отношении этого насекомого. Из всех протестированных лектинов

наибольший эффект продемонстрировал лактозосвязывающий лектин. Было показано, что гриб *C. nebularis* богат различными лектинами с разносторонней биологической активностью, включая инсектицидные свойства. Таким образом, лектины *C. nebularis* могут быть использованы в качестве натуральных инсектицидов [145].

За последнее время появилось много работ, связанных с лектинами беспозвоночных. У морских беспозвоночных, таких как двустворчатые моллюски, лектины играют важнейшую роль в иммунной системе, защищая их от патогенов. В этих организмах было обнаружено новое семейство лектинов, названное митилектинами. Для них была установлена способность оказывать противогрибковое, антибактериальное и противораковое свойство, что указывает на значительный потенциал их применения в биомедицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Митилектин из мидий *Mytilus californianus* проявлял противогрибковую активность в отношении нескольких фитопатогенных грибов, включая *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* и *P. aphanidermatum*. В целом, это исследование расширяет наше понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе разнообразной активности митилектинов, и может помочь в разработке искусственных лектинов со специфическими и улучшенными свойствами связывания [146].

Антимикробная активность лектинов. Одной из важных функций лектинов различных организмов является их антимикробная активность. Так, агглютинин *Allium sativum* (ASA), выделенный из луковиц чеснока, обладал многообещающим терапевтическим потенциалом. Его исследовали на предмет противораковых, противомикробных и других свойств. Было изучено его влияние на условно-патогенные грибки *Candida auris* и *Candida glabrata*, вызывающие тяжелые заболевания у людей, а также оценена основа этих противогрибковых эффектов. Противогрибковая активность АСК в отношении различных штаммов *C. glabrata* и *C. auris* была выявлена в диапазоне концентраций MIC₅₀ от 30 до 70 мкг/мл.

Рост грибков был значительно подавлен при обработке агглютинином в концентрациях MIC₅₀ и 2MIC₅₀. В клетках грибов после обработки агглютинином была обнаружена выработка перекиси водорода, отмечены изменения в морфологии и целостности клеток. Был установлен антибиоплёночный эффект данного агглютинина в отношении рода *Candida* и трёх бактериальных штаммов (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*). Максимальный антимикробный эффект среди бактериальных штаммов был получен в отношении *K. pneumoniae*. Эти результаты могут стать основой для разработки препаратов лектинов в качестве противомикробных средств [147].

Антимикробные свойства лектинов уже находят своё применение в ряде случаев, связанных с хроническими воспалениями на фоне ослабленного иммунитета. Так, при диабете нарушается процесс регенерации тканей, что делает их уязвимыми для колонизации *S. aureus*, патогена, известного своей устойчивостью к антимикробным препаратам. Были проведены исследования, показавшие, что лектины семян *C. mollis* способны значительно подавлять развитие инфекции и дополнительно способствовать функции образования коллагена [148].

Известно, что в природе основным конкурентом бактерий за питательные вещества в биоценозе являются микромицеты. Микромицеты способны синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, многие из которых могут обладать потенциальной антимикробной активностью. Одними из таких веществ являются лектины [149,150].

Лектины могут оказывать опосредованное, подавляющее влияние на развитие патогенных микроорганизмов. *Listeria monocytogenes* – патогенная бактерия, которая может образовывать биоплёнки на предприятиях пищевой промышленности, что позволяет ей выживать, несмотря на применяемые меры контроля. Группой учёных из Словении были проведены исследования, показавшие, что грибковые лектины значительно замедляли развитие биоплёнки

даже при комнатной температуре, что было связано с действием лектинов на процесс адгезии патогенной бактерии. Наблюдаемая антибиоплёночная активность грибковых белков позволила предположить, что они могут модулировать взаимодействие между бактериями и/или между бактериями и поверхностями. Данное свойство может быть использовано для борьбы с патогенами путём снижения загрязнения поверхностей [151].

Аналогичная ситуация рассматривается относительно грамотрицательной бактерии *Campylobacter jejuni*. Ее развитие является одной из наиболее распространённых причин пищевых отравлений во всём мире. Механизм её адгезии опосредован несколькими бактериальными факторами, включая жгутики, белковые адгезины, липоолигосахариды, протеазы и факторы хозяина, такие как поверхностные гликаны на эпителиальных клетках и муцины. Грибковые лектины, связывающие углеводы, могут связываться со специфическими гликанами на клетках хозяина и бактериальных клетках и таким образом влиять на патогенез. В данной работе изучали влияние грибковых лектинов и ингибиторов протеаз на адгезию *C. jejuni* к модельным биотическим поверхностям (муцину, фибронектину и коллагену) и клеткам Caco-2, а также на инвазию клеток Caco-2. Лектины *Marasmius oreades* (МОА) и тектонин 2 *Laccaria bicolor* (Тес2) продемонстрировали высокую эффективность во всех экспериментах. Предварительная инкубация лектинов с *C. jejuni* или с клетками Caco-2 значительно снижала способность *C. jejuni* прикрепляться к клеткам Caco-2 и проникать в них. Одновременная инкубация клеток и лектина показала наибольшее снижение количества адгезивных *C. jejuni* клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что грибковые лектины являются многообещающим средством для профилактики и лечения инфекций, вызванных *C. jejuni* [152].

Антивирусная активность лектинов. Антивирусная активность лектинов представляет собой ещё одно важное направление исследований. Вирусы, содержащие гликопротеины в составе оболочки, потенциально уязвимы для

лектинов, распознающих их углеводные детерминанты. Антивирусные свойства продемонстрированы как у растительных, так и у микробных лектинов [153,154].

Отдельную группу составляют лектины, относимые к рибосом-активирующим белкам: их действие связывают с попаданием токсичного домена в цитоплазму клеток хозяина при формировании инфекционного процесса и последующим ингибированием синтеза белка. Важную роль для защиты растений может играть пространственное распределение таких лектинов: они накапливаются в запасающих тканях семян, в вакуолях клеток, активно разрушающихся при повреждении, или в зонах, прилегающих к корням, то есть в местах вероятного внедрения патогенов [155].

В последние годы были достигнуты значительные успехи в изучении лектинов растений и микроорганизмов как терапевтических средств против различных вирусных заболеваний. Среди них маннозоспецифичные лектины зарекомендовали себя как перспективные противовирусные средства против различных вирусов, таких как ВИЧ, грипп, герпес, Эбола, гепатит, коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома-1, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома и новейший коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома-2. Было обнаружено, что связывание маннозосвязывающих лектинов (MBL) из растений и микробов с N-гликанами, содержащими маннозу (которые могут быть простыми или сложными), гликопротеинов, находящихся на поверхности вирусов, является высокоспецифичным и в основном определяет их противовирусную активность. Было показано, что MBL воздействуют на различные этапы жизненного цикла вируса, включая прикрепление, проникновение и репликацию. Доказано, что маннозоспецифичные лектины из растений и микроорганизмов можно применять в диагностике и лечении вирусных заболеваний [156].

Интересные исследования связаны с изучением лектинов водорослей. Водоросли, как и микромицеты, обладают огромным потенциалом в качестве

источника ценных метаболитов с разнообразными биотехнологическими применениями, включая использование в качестве удобрений, кормов, продуктов питания и даже фармацевтических прекурсоров. Среди многочисленных соединений, содержащихся в водорослях, лектины привлекают особое внимание своей уникальной структурой и специфичностью в отношении углеводов, что отличает их от лектинов, получаемых из других источников. Лектины водорослей продемонстрировали удивительную эффективность против широкого спектра вирусов, что делает их перспективными для разработки противовирусных препаратов. Стоит отметить, что некоторые виды водорослей уже успешно коммерциализированы благодаря их противовирусному потенциалу. Водоросли являются ценным и универсальным ресурсом, а их лектины открывают захватывающие перспективы для разработки новых противовирусных средств, которые могут привести к созданию передовых методов противовирусной терапии [153].

Кроме протививирусной активности лектины, связывающие фукозу, продемонстрировали различную и сильную антипролиферативную активность. Так, лектин *Aleuria aurantia* (AAL) оказывал наиболее сильное воздействие. В работе было показано, что грибковые лектины являются ценными инструментами для выявления новых терапевтических мишеней, которые могут вызывать гибель раковых клеток или останавливать их рост с помощью различных механизмов [157].

Ученые из Калифорнийского университета разработали новый класс иммунопрепаратов на основе лектинов, которые используют принцип «липучки» для уничтожения опухолевых клеток. Созданные ими молекулы GlyTR связываются с углеводными антигенами, которые обильно экспрессируются злокачественными клетками, но практически отсутствуют в нормальных тканях; это взаимодействие привлекает к опухолевым клеткам Т-лимфоциты. Такой подход может быть полезен при разработке универсальной иммунотерапии, не зависящей от свойств опухолевого микроокружения [158,159].

Таким образом, лектины, в том числе грибные лектины, являются перспективными биологически активными веществами, составляющими основу препаратов настоящего и будущего.

1.4 Анализ различных методов и условий культивирования микромицетов рода *Alternaria*

Мицелиальные грибы, в том числе рода *Alternaria*, могут расти и преобразовывать широкий спектр встречающихся в природе соединений, органическую биомассу и отходы в различные продукты. Известно их использование для промышленного производства ферментов, токсинов, низкомолекулярных соединений, органических кислот, липидов и других продуктов. Новые направления – использование при работе с грибами достижений в области метаболической и белковой инженерии, улучшение штаммов с помощью технологии CRISPR-Cas9. Однако, несмотря на значительный прогресс, в работе с мицелиальными грибами многие вопросы все еще находятся в зачаточном состоянии и требуют дальнейшей разработки не только в развитии генной инженерии, но и в совершенствовании классических технологических процессов [160].

Существует определенная классификация культивирования микроорганизмов. Микромицеты можно культивировать как в жидких, так и на твердых питательных средах, поверхностным или глубинным методом, в аэробных или анаэробных условиях, в зависимости от требований конкретного вида.

Культивирование микромицетов на твердой поверхности. Культивирование микроорганизмов на твердых питательных средах обычно используют для выделения чистых культур, определения морфологии и антагонистических свойств. Данный вид культивирования позволяет лучше наблюдать за ростом мицелия и образованием спор у микромицетов,

осуществлять биоконверсию сельскохозяйственных отходов [161].

Культивирование микроорганизмов на твердых питательных средах имеет ряд преимуществ. На твердой среде удобнее собирать споры микромицетов, нет необходимости в специальном оборудовании, позволяющем проводить разделение биомассы и культуральной жидкости. Культуры микроорганизмов, в том числе микромицетов, относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды. Более того преимуществом является простота конструкций используемых биореакторов, систем подачи воздуха и регулирования температурно-влажностного режима.

Среди недостатков метода культивирования на твердых средах, прежде всего, можно отметить ограничения по выращиванию больших количеств биомассы. Кроме того, рост на твердых питательных средах не обеспечивает однородность популяции клеток, отмечается неравномерность распределения их количества по среде, что приводит к неполному использованию субстрата. Тем не менее, данный метод имеет свои преимущества и поэтому используется для культивирования грибов, в том числе и микромицетов рода *Alternaria*.

Так, при получении глюкоамилазы штаммом *A. alternata* был использован метод культивации микромицета на твердой питательной среде. Именно при твердофазном культивировании наблюдался наибольший выход глюкоамилазы [162].

Было показано, что *A. alternata* может расти на разных субстратах, таких как пшеничные отруби, сухой картофельный порошок, чайные листья, рисовая шелуха или кожура сахарного тростника. Среди всех субстратов сухой картофельный порошок (10 г) оказался лучшей ферментационной средой для роста грибкового штамма и получения фермента. Процесс культивации проводился в асептических условиях. Стерилизация среды проводилась при 121 °С и давлении 1,5 атм. в течение 2 ч.

Наибольшая продукция глюкоамилазы была получена после 72 ч инкубации продуцента в инкубационной камере с увлажненным субстратом (картофельным

порошком), после засева споровым инокулятом. Концентрация споровой суспензии ($4:42 \times 10^{-7}$ спор). Температура культивирования микромицета 30 °С и рН питательной среды – 5,0. В качестве дополнительных компонентов в среду вносили крахмал 5 % и мальтозу как источники углерода, а также дрожжевой экстракт в качестве азотного питания. Данная среда позволила получить максимальный титр активности глюкоамилазы и наибольшую удельную активность (39,2 U/мг). Разработанные условия культивирования микромицета были наиболее подходящими для роста *A. alternata* на твердых средах и продукции глюкоамилазы в процессе твердофазной ферментации [162].

Культивирование микромицетов в жидких питательных средах. Для получения больших объемов биомассы и выхода продуктов метаболизма лучше использовать культивирование в жидких питательных средах. Кроме того, этот метод позволяет изучать динамику роста и биохимическую активность грибов [163].

Жидкофазный процесс культивирования микроорганизмов проводят поверхностным или глубинным методом.

Поверхностные жидкофазные процессы в биотехнологических производствах используют для культивирования мицелиальных грибов при получении ферментных препаратов, органических кислот или других продуктов метаболизма. Для этих целей применяют кюветный способ культивирования. Среда в небольшом объеме загружается в стерильные кюветы, размещаемые на открытых стеллажах в растильных камерах с регулируемым температурно-влажностным режимом. Вентиляцию помещений осуществляют очищенным стерильным воздухом, который одновременно может выполнять функцию теплового агента.

Микроорганизмы растут на поверхности жидкой питательной среды в виде пленки. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцеры и поступает на дальнейшую обработку.

Глубинный метод культивирования микроорганизмов заключается в

выращивании клеток во всем объеме жидкой питательной среды. Данный метод технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации; позволяет делать значительно легче переход к большим масштабам производства. Данный метод культивирования позволяет проводить весь процесс в строго асептических условиях [163].

Примером жидкофазного культивирования грибов рода *Alternaria* можно продемонстрировать на примере получения лекарственного препарата паклитаксела [164].

В данной работе проводилась оптимизация питательной среды и условий культивирования продуцента *A. alternata* для получения максимального выхода таксоидов. В работе поэтапно менялись несколько условий ферментации, включая изменения в значениях рН среды (рН 4,0-7,0), исследовались возможности культивирования микромицета на различных типах углеродного и азотного питания для роста микромицета и образование паклитаксела. Суспензионные культуры создавали путем погружения свежего мицелия в картофельно-декстрозный бульон, рН 5,5. Культивирование проводилось на возвратно-поступательном шейкере (110 об/мин.) в течение 7 дней. Температура культивирования 25 ± 2 °С.

Таким образом, культивирование грибов рода *Alternaria* можно проводить как твердофазным, так и жидкофазным методами, в зависимости от поставленной задачи.

Оптимизация питательной среды для роста микромицета и продукции метаболитов. Следующей задачей для получения хорошего роста и продукции метаболитов продуцента является процесс оптимизации питательных веществ в составе среды. Тщательная корректировка состава среды посредством использования различных источников углерода и азота, а также одновременное изменение рН среды оптимизирует рост микроорганизмов и синтез вторичных метаболитов [164,165].

Для получения устойчивого роста микромицета *A. alternata* и получения

палитаксела исследователи проводили оптимизацию питательной среды по источникам углерода и азота. Осуществлялся подбор оптимальных значений pH питательной среды. На первом этапе в течение одной недели изучалось влияние pH 4,0; 5,0; 6,0 и 7,0 на рост мицелия в бульоне. Согласно результатам, pH 6,0 соответствовал оптимуму роста и выходу таксанов [166].

Чтобы избрать лучший источник углерода, микромицет *A. alternata* культивировали в простых средах, содержащих водные растворы солодового экстракта, сахарозы, сорбита, глюкозы, растворы фруктозы и маннита. На основании результатов экспериментов, сахароза в концентрации 5%, была выбрана в качестве наилучшего источника углерода.

Действие различных источников азота оценивали путем культивирования грибка в средах, содержащих 5 % сахарозы, pH 6,0 с добавлением солей азота $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и KNO_3 в концентрации 2,5 мМ каждого. По результатам экспериментов в качестве наилучшего источника азота был выбран фосфат аммония. Кроме того, было установлено, что фосфат аммония в концентрации 2,5 мМ способствовал максимальному росту и продукции таксана.

На всех этапах мицелий собирали, тщательно промывали при пониженном давлении, точно взвешивали, быстро замораживали жидким азотом и хранили при минус 80 °С. Качественный и количественный анализ таксанов и анализировали методом ВЭЖХ.

В конечном итоге результаты исследований показали, что в среде, содержащей сахарозу 5 % и фосфат аммония 2,5 мМ, при значении pH 6,0 питательной среды и с добавлением пектина, микромицет *A. alternata* быстро и устойчиво рос, продуцируя паклитаксел с самым высоким выходом (94,8 мкг). Пектин, добавленный в среду в качестве дополнительного питания, значительно увеличивал рост микромицета и выход таксоидов [167].

Оптимизация питательной среды для роста микромицетов рода *Alternaria* рассматривается также в работах Николаевой с соавторами [168].

В данной работе изоляты микромицетов рода *Alternaria* выращивали на агаризованных и жидких средах (стационарная и глубинная культуры). В работе использовали среды: картофельно-глюкозная, Чапека, картофельно-морковная, морковная, капустная, перечная, томатная. Кроме стандартной картофельно-глюкозной среды (200 г картофеля и 20 г глюкозы на 1 л среды) использовали картофельно-глюкозную среду с разным соотношением картофеля и глюкозы. Картофельно-морковная среда содержала в 1 л 20 г картофеля и 20 г моркови; другие овощные отвары содержали по 40 г сырья в 1 л среды; 50 % и 25 % томатные среды содержали 50 % и 25 % томатного сока соответственно.

При выращивании микромицетов на агаризованных средах в чашки Петри наливали одинаковый объем питательной среды (20-25 мл). При выращивании грибов на жидких питательных средах использовали колбы Эрленмейера со 100 мл соответствующей среды (стационарная культура) или качалочные колбы с 200-250 мл среды (глубинная культура). Биомассу гриба определяли весовым методом.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что лучший рост микромицетов рода *Alternaria* наблюдается на глюкозо-картофельной среде. Использование твердофазного культивирования позволило лучше наблюдать скорость роста культуры и ее морфологию. При жидкофазном культивировании был отмечен значительный рост микромицета.

Способ культивирования грибов и состав питательной среды существенно влияют на формирование комплекса метаболитов. Так при выращивании *Monascus purpureus* на рисе в условиях твёрдофазной ферментации содержание микотоксина цитринина в экстрактах было ниже, чем при глубинном культивировании этого гриба; однако уровень продукции азафилонов не зависел от выбранного способа культивирования. Это подчёркивает, что жидкостное и твёрдофазное культивирование может по-разному влиять на отдельные группы метаболитов [169].

Для некоторых видов *Alternaria* твёрдофазное культивирование также оказалось более предпочтительным с точки зрения синтеза токсинов. Так, для *A. sonchi* наибольший выход альтернэтаноксинов наблюдали при выращивании гриба на перловой крупе; полученные метаболиты проявляли выраженную фитотоксичность и антимикробную активность. В этом случае изменение агрегатного состояния субстрата и его состава напрямую отражалось на качестве и количестве продуцируемых гликопротеинов [170].

Важным фактором получения необходимого продукта является источник углерода в среде. Установлено, что простые сахара в качестве источника углерода в жидкой среде, стимулировали образование афлатоксинов у представителей *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*), тогда как пептон и другие, более сложные углеводные компоненты, напротив, приводили к снижению уровня их биосинтеза. Таким образом, изменение углеводного компонента среды может служить инструментом целенаправленного регулирования токсигенной активности продуцента [171].

Значимый вклад в получении продукции вносит и форма азота. Показано, что использование нитрата в качестве единственного источника азота в среде для *A. parasiticus* сопровождалось подавлением синтеза предшественников афлатоксина, тогда как у *A. nidulans* при аналогичных условиях выход стеригматоцистина возрастал. Это демонстрирует видоспецифические особенности регуляции метаболизма и указывает на необходимость подбора азотного компонента с учётом целевого продукта [172].

Отдельной группой факторов, влияющих на метаболизм, являются ионы металлов. Для *Paraphaeosphaeria quadriseptata* установлено, что повышенные концентрации ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Cr^{3+} стимулируют образование моноциллина в культуре. В то же время для *Alternaria brassicola* описан противоположный по сути эффект: при выращивании гриба в условиях дефицита меди уровень брассиколина А возрастал в сотни раз (до 360-кратного увеличения по сравнению

с контролем) [173].

Важное значение для роста и метаболизма грибов имеют физико-химические факторы. Среди них – влияние температуры и pH питательной среды.

В работе Вакьюэра с соавторами (2016 г.) было показано, что культивирование гриба *A. arborescens* при повышенной температуре (30 °C) и повышенной активности воды (0,995 aw) способствовало образованию микотоксинов [174].

Аналогично, повышенная температура (30 °C) и отсутствие нитрата в питательной среде способствовали образованию фитотоксина брассициколина А при культивировании *A. brassicicola* на картофельно-декстрозной среде. Однако выход депудецина при повышении температуры культивирования снижался [175].

Оптимальная температура необходима и для получения ферментов α -амилазы и амилоглюкозидазы при культивации грибами [176].

pH среды – важный фактор, влияющий на скорость роста, интенсивность метаболизма, ферментативную активность и выживание микроорганизмов. Большинство грибов предпочитают pH 4,0-6,0. Неверно подобранное значение pH среды может приводить к ингибции ферментов, разрушению клеточных структур, изменению проницаемость клеточной оболочки.

Значения среды pH 4,0-4,5 были оптимальными для образования микотоксинов большинством видов грибов рода *Alternaria*. Повышение pH питательной среды до 5,5 в глубинной культуре *A. alternata* приводило к снижению образования микотоксинов.

В то же время для других видов грибов рода *Alternaria* реакция питательной среды pH 4,0-4,5 была оптимальной для образования микотоксинов.

Культивирование грибов *A. brassicicola* в различных условиях позволило получить семь новых модифицированных дитерпенов фузикоокканового типа [177]. Также удалось получить камптотецин из *A. brassicicola*, обладающего сильным антипролиферативным и ингибирующим действием на топоизомеразы [178].

Таким образом, поиск эффективных и дешевых субстратов, оптимизация питательной среды и внесение стимулирующих добавок, изменение условий культивирования – важные факторы для активного роста продуцента и синтеза биологически активных веществ. Дальнейшее развитие микологии будет не в малой степени связано с изучением изменений в экспрессии генов грибов, что поможет выявить потенциальные пути получения новых метаболитов [179].

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы, использованные в работе

Химические реактивы, использованные в работе: соляная кислота (х.ч.); серная кислота (х.ч.); гидроксид натрия (х.ч.); хлорид магния (х.ч.); хлорид марганца(II) (х.ч.); хлорид калия (х.ч.); хлорид натрия (х.ч.); сульфат железа (II) (х.ч.); сульфат цинка (х.ч.); сульфат меди (II) (х.ч.); хлорид кальция (х.ч.); нитрат натрия (х.ч.); нитрат аммония (х.ч.); сульфат аммония (х.ч.); аспарагин (ч.д.а.); аргинин (ч.д.а.); глицин (ч.д.а.); цистеин (ч.д.а.); треонин (ч.д.а.); триптофан (ч.д.а.); магния сульфат (х.ч.); гидроортофосфат калия (х.ч.); D-глюкоза (ч.д.а.); D-сахароза (ч.д.а.); крахмал (ч.д.а.); 20 mM ацетатный буфер; 20 mM фосфатный буфер; 20 mM Трис-HCl буфер; 20 mM глицин-NaOH буфер; пептон (ООО НПО «Порт-Петровск»); карбонат натрия (х.ч.); агар сухой микробиологический для бактериальных целей («С.Е.Роерг GmbH», Германия).

Природное сырье, использованное в работе: почва Татарстана, Пестричинского района; картофель, клубни сорта «Ред скарлетт», зерна озимой пшеницы сорта «Казанская 560» и семена посевного гороха сорта «Усатый кормовой».

В работе использовали штаммы микромицетов из Всероссийской коллекции микроорганизмов *Alternaria alternata* F-1120 и *Fusarium oxysporum* F-137; штаммы из музея культур кафедры биотехнологии Первого государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова – *Alternaria alternata* 7.2/8, *Alternaria solani* 7.3/4 и *Alternaria infectoria* 7.3/2; штаммы из музея культур кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Казанского федерального университета – *Fusarium solani* 6; а также изоляты четырех штаммов микромицетов рода *Alternaria*, выделенных из образцов почвы, с клубней картофеля и зерна пшеницы.

Бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 и *Salmonella typhimurium* TA98 из музея культур кафедры микробиологии Казанского федерального университета.

Культивирование проводили на питательных средах следующего состава:

1. Картофельно-глюкозная среда (КГС). В 1000 мл водопроводной воды вносили измельченную массу картофеля массой 200 г и кипятили в течение 30 мин. Далее полученный отвар отделяли от картофеля фильтрованием, объем раствора доводили водопроводной водой до 1000 мл. К картофельному отвару добавляли 20 г глюкозы.

2. Картофельно-глюкозная среда с агаром: картофель – 200 г, глюкоза – 20 г, агар-агар – 20 г, дистиллированная вода – 1000 мл.

3. Среда Чапека: сахароза – 30 г, NaNO_3 – 3,0 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

4. Среда Сабуро: пептон – 10,0 г, глюкоза – 40 г, дистиллированная вода – 1000 мл [180].

5. Среда Кэра: сахароза – 30,0 г, NaNO_3 – 2,0 г, KH_2PO_4 – 1,0 г, KCl – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, FeSO_4 – 0,01 г, дрожжевой экстракт – 0,5 г, дистиллированная вода – 1000 мл [180].

6. Картофельно-морковная: глюкоза – 20,0 г, фруктоза – 0,10 г, сахароза – 0,9 г, крахмал – 14 г, водопроводная вода – 1000 мл [168].

7. Мясо-пептонный агар: мясной бульон 1000 мл, пептон – 20 г, NaCl – 1,5 г, агар-агар – 20 г.

8. 2 % голодный агар: агар-агар – 20 г, вода дистиллированная – 1000 мл .

9. Полужидкий 0,6 % агар: агар-агар – 6,0 г, NaCl – 6,0 г, вода дистиллированная – 1000 мл [181].

10. Нижний агар: 2 % голодный агар – 300 мл, 20 % раствор глюкозы – 10 мл, солевой концентрат – 100 мл, 1 % раствор сернокислого магния – 2 мл [181].

Среды стерилизовали в автоклаве «ВК-75-01» (Россия) в течение 20 мин при

температуре 112-120 °С при 0,5-1,0 атм. в зависимости от состава. рН питательной среды для роста микромицетов устанавливали в диапазоне 6,2-6,5.

2.2 Выделение чистых культур микромицетов рода *Alternaria*

Выделение чистой культуры микромицетов рода *Alternaria* осуществляли методом истощающего штриха [180].

Для выделения чистых изолятов из почвы Республики Татарстан, Пестричинского района, создавали почвенную болтушку (5 г почвы на 50 мл стерильной воды), готовили 10-кратные разведения, из которых делали посев поверхностным методом на агаризованную питательную среду (КГА) для получения отдельных колоний. Затем колонии и препараты мицелия гриба исследовали с помощью микроскопа «Micros MCX100LCD» (Австрия). Колонии, соответствующие по морфологии роду *Alternaria*, многократно пересеивали на чашках Петри с КГА средой.

Микромицеты с зерна пшеницы и картофеля выделяли, используя поврежденные объекты.

Выделение микромицетов с клубней картофеля осуществляли методом выявления внутренних поражений, используя глазки с подлежащей тканью (3 мм) после дезинфекции клубней. Рост микромицетов наблюдали на питательной среде Чапека [182].

Выделение микромицетов с зерна пшеницы проводили после поверхностной дезинфекции 2 % раствором перманганата калия с последующей промывкой стерильной водой. Затем зерна пшеницы раскладывали на твердую питательную среду Чапека.

Инкубацию посевов вели при температуре 28 °С в термостате «ТС-1/80СПУ» (Россия) в течение 5-7 суток. Колонии, соответствующие по морфологическим и физиологическим параметрам микромицетам рода *Alternaria*,

отсевали в чашки Петри со средой КГА для получения чистых изолятов грибов.

Выделенные изоляты микромицетов рода *Alternaria* оценивали по культурально-морфологическим показателям, принятым для определения их родовой принадлежности: наличие пигмента, характер роста колонии, размеры, форма и расположение конидий, тип конидиеносца, наличие перегородок, склероций и другие показатели. Микроскопическое исследование мицелия проводили при увеличении в 1000 раз [183].

Все работы с микроорганизмами проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе «ВЛ-12» (Россия).

2.3 Скрининг выделенных изолятов рода *Alternaria* на способность к синтезу лектинов

Культивирование выделенных изолятов микромицетов рода *Alternaria* проводили на стерильной картофельно-глюкозной среде, при температуре 28 °С, в течение 6 суток. Рост и накопление биомассы контролировали на аналитических весах «HR-250AZG» (Япония).

Определение наличия активности эндогенных и экзогенных лектинов осуществляли на 6 сутки культивирования продуцента. В качестве контроля по наличию лектинов в грибах в работе использовали изоляты микромицетов рода *Fusarium*.

2.4 Молекулярно-генетическая идентификация изолята *Alternaria alternata* 4

С целью определения видовой принадлежности выделенного изолята микромицета нами были проанализированы нуклеотидные последовательности ITS региона и частичной последовательности фрагмента гена *tub2*.

Для наработки продуктов ПЦР амплификации и использовались

консервативные праймеры ITS1F (СТТGGTCATTTAGAGGAAGTAA) и ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC), а также праймеры для наработки последовательности части гена, кодирующего β -тубулин, tub2F – (TGTGCACSTTTCCGACCG) и tub2R (TCCGGATTTGGCCAAGACGA) [185].

Реакцию проводили с использованием амплификатора Veriti (Applied Biosystems, США) по следующему температурному протоколу: 95 °С – 3 мин, 95 °С – 30 с, 54 °С – 30 с, 72 °С – 40 с, 72 °С – 3 мин, 34 цикла.

ПЦР продукт разделяли при помощи горизонтального электрофореза в 1 % агарозном геле. Выделение ДНК из геля производилось с использованием набора *Cleanup mini* (ЗАО «Евроген», Москва, Россия). Секвенирование по Сэнгеру образцов проводилось компанией «Евроген» (ЗАО «Евроген», Москва, Россия). По полученным хроматограммам была определена консенсусная последовательность участков ДНК при помощи программы *Snapgene* и сопоставлена с известными последовательностями посредством сервиса NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.5 Культивирование изолята микромицета *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на питательных средах

Культивирование *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на поверхности агаризованной питательной среды КГА осуществляли для контроля роста изолята и его последующего пересева. Чашки Петри с посевами гриба помещали в термостат «ТС-1/80СПУ» (Россия) при температуре 28±2 °С и культивировали в течение 9 дней.

Культивирование *A. alternata* ВКПМ F-2039 на жидких питательных средах, подбор питательных сред для выращивания *A. alternata* ВКПМ F-2039 и получения активных лектинов, эксперименты по определению влияния компонентов питательной среды, динамики роста продуцента проводили

периодическим жидкофазным культивированием глубинным способом.

Рост продуцента лектинов осуществляли в жидкой питательной среде в стационарных условиях при внесении посевного материала в соотношении 10 % к общему объему питательной среды. Из центра выросшей колонии микромицета, стерильно отбирали мицелий в количестве 0,04 г/л и помещали на твердую питательную среду КГА для сохранения изолята или переносили мицелий в колбу с Эрленмейера объемом 700 мл, содержащей 200 мл КГС для жидкофазного культивирования. Микромицет *A. alternata* ВКПМ F-2039 культивировали в термостате «ТС-1/80 СПУ» (Россия) в стационарных условиях в течение 5-7 дней при температуре 28 ± 2 °С. Культивирование гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 проводили в течение 4-5 дней в шейкере-инкубаторе (Infors HT Ecotron, Швейцария) при 200 об/мин.

Рост и накопление биомассы микромицета контролировали весовым методом на электронных весах «MERTECH» модели M-EX 126CEJR.

2.6 Подбор состава питательной среды для получения биологически активных лектинов при жидкофазном культивировании *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

Микромицет выращивали на стерильной КГ среде жидкофазным методом при периодическом культивировании в стационарных условиях роста. Температура культивирования 28 °С.

Рост и накопление биомассы контролировали весовым методом на электронных весах аналитических весах «HR-250AZG» (Япония). Активность выделенных лектинов определяли методом реакции прямой гемагглютинации.

Изучали влияние на рост и образование активных лектинов, углеводного субстрата (глюкозы, сахарозы и крахмала), органических и неорганических источников азота (пептон, NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) и аминокислот

(аспарагина, аргинина, глицин, цистеина, треонина, триптофана), в качестве дополнительных факторов роста [121].

2.7 Выделение лектинов микромицета рода *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

Для выделения эндогенных лектинов микромицетов рода *Alternaria* использовали мицелий 6 суточной культуры.

Биомассу мицелия собирали фильтрацией через промышленную ткань для лабораторного биопроцессинга фирмы «АкваАналитикс Техника» с последующим удалением остатков культуральной жидкости многократным промыванием мицелия стерильной дистиллированной водой, а затем 20 мМ Tris-HCl буферным раствором (рН 7,2).

Извлечение мицелиальных лектинов проводили с помощью гомогенизации мицелия на размольной гарнитуре ESSA марки B800 в том же растворе буфера в соотношении 1:1 (масса/объем). Полученную однородную массу оставляли при перемешивании в течение 2-3 ч при 4 °С. Удаление осадка проводили центрифугированием «Cence H1750R» (Китай) при 5000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант проверяли на наличие белка и лектинов.

Присутствие экзогенных лектинов устанавливали в культуральной жидкости после отделения биомассы мицелия гриба.

Активность эндогенных и экзогенных лектинов микромицетов рода *Alternaria* определяли с помощью реакции гемагглютинации.

В работе использовали также лектины *A. alternata* ВКПМ F-2039 различной степени очистки: лектин после разрушения мицелия гриба и центрифугирования (исходный препарат), препарат лектина, полученный осаждением белка сульфатом аммония и последующим диализом, и препарат, полученный объединением фракций, проявляющих гемагглютинирующую активность, после

хроматографии.

2.8 Подготовка эритроцитов к реакции гемагглютинации и их модификация

Эритроциты для реакции прямой гемагглютинации (РПГА) получали по методу, предложенному Луциком с соавторами [185].

Для определения активности лектинов проводили РПГА на нативных и модифицированных эритроцитах человека 1 группы крови. Модификацию поверхности эритроцитов производили в трех вариантах, путем добавления к осадку из эритроцитов 1 группы крови человека раствора нейраминидазы (0,2 ед./мл), трипсина и протеазы (1 мг/мл). Соотношение эритроцитов и раствора ферментов 1:2 [186]. Хранение суспензии эритроцитов осуществляли при 4 °С не более суток.

Реакцию прямой гемагглютинации осуществляли в планшетах для иммунологических реакций [187]. Для этого, в лунки планшета вносили по 0,025 мл белкового экстракта, который последовательно двукратно разводили раствором буфера. Затем в реакционную смесь добавляли 2 %-ную суспензию эритроцитов и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Титр гемагглютинации выражали как максимальное разведение или минимальная концентрация лектина в растворе, при которой наблюдается видимая реакция гемагглютинации эритроцитов.

2.9 Хроматография лектина *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

Для проведения хроматографии эндогенный лектин из экстракта мицелия *A. alternata* ВКПМ F-2039 осаждали методом концентрирования белков кристаллическим сульфатом аммония со степенью насыщения 65 % [188].

Необходимая концентрация раствора достигалась добавлением в супернатант насыщенного раствора соли. Через 12 ч реакции отделяли осадок путем центрифугирования при 10000 g в течение 15 мин и растворяли его в наименьшем объеме стандартного буфера. Диализ осажденного белка осуществляли в диализных мешках с размером пор 12-14 кДа («Orange Scientific», Бельгия) в течение двух суток против этого же раствора буфера. Полученный концентрат использовали для дальнейшей очистки лектина.

Разделение мицелиального лектина микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 проводили с применением хроматографической системы низкого давления BioLogic LP («Bio-Rad»). Была проведена серия ионообменных хроматографий на колонке Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q (анионообменная), предварительно уравновешенной 20 mM Tris-HCl буфером (pH 7,2). Связанный лектин элюировали с колонки High Q линейным градиентом концентрации NaCl 0→1 M при скорости потока 3 мл/мин. Непосредственно перед хроматографией растворы буфера и белковых образцов (клеточный экстракт) фильтровали с использованием специальных стерильных мембранных фильтров Millex (диаметр 33 мм, диаметр пор 0,45 мкм, полиэтилсульфон, Millipore).

После хроматографии фракции белков анализировали на наличие титра активности лектинов в реакции гемагглютинации.

2.10 Изучение влияния лектина *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на рост и развитие растений

В работе использовали семена пшеницы сорта «Казанская-560» и семена посевного гороха сорта «Усатый кормовой».

Пшеницу и горох замачивали на 24 ч в растворах лектина с концентрацией 5,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл. При изучении всхожести семян концентрацию увеличивали до 80 мкг/мл и 400 мкг/мл, а при изучении действия

очищенной формы лектинов снижали концентрацию до 1,25 мкг/мл, 2,5 мкг/мл. Контролем служил раствор 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,2). Затем обработанные семена раскладывали на влажную поверхность фильтровальной бумаги в чашках Петри.

В экспериментах анализировали всхожесть, энергию прорастания и развитие растений пшеницы и гороха, предварительно обработанных препаратом лектина в различных концентрациях [189]. На 10 сутки осуществляли морфометрический анализ растений. Изучали изменение параметров роста и развития растений (длину и вес проростков и корней растений).

2.11 Изучение влияния лектина *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на устойчивость растений к фитопатогенам

Исследование влияния лектина гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 на устойчивость растений к фитопатогенам проводили на семенах гороха «Усатый кормовой».

Для этого осуществляли обработку корней 3-х дневных проросших семян препаратом лектина в течение 24 ч в концентрациях 5,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл. После обработки корней растворами лектинов на 5-ые сутки замачивали корни растений споровой суспензией фитопатогенного микромицета (титр 10^5 макроконидий/мл). В качестве фитопатогенов использовали штамм *A. solani* и штамм *F. oxysporum*. Затем проращивание растений продолжали в кюветах при 23 ± 2 °С и 12-ти часовом светопериоде с освещенностью 100 Вт/м². На 10 сутки осуществляли определение морфометрических показателей, параметров роста и развития растений (длина и вес проростков и корней, формирование листовых пластинок, наличие некроза тканей).

Контролем служили растения, проросшие семена которых замачивались в растворе 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,2), а также растения, проросшие семена

которых обрабатывались споровой суспензией фитопатогенов.

Степень развития альтернариоза и фузариоза регистрировалась визуально по изменению формирования корней и листовой поверхности, а также по наличию черных точек и побуревшей площади корневой системы.

Способность лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 вызывать индуцированную устойчивость у растений была изучена по определению пероксидазной активности в корневой системе гороха.

Пероксидазная активность была нами изучена в 5-х вариантах: 1 – контроль (исходные растения), 2 – растения, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10,0 мкг/мл, 3 – контроль с инфицированием растений спорами фитопатогенного штамма *F. oxysporum*, 4 – растения, обработанные известным препаратом «Циркон» (концентрация 10 мкг/мл) и инфицированные спорами штамма *F. oxysporum*, 5 – растения, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (концентрация 10,0 мкг/мл) и инфицированные спорами штамма *F. oxysporum*.

Активность пероксидазы была изучена коллометрическим методом А.Н. Бояркина, с модификациями, предложенными Н.Е. Павловской [190]. Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина пероксидом водорода под влиянием фермента растений.

2.12 Этапы получения препарата Барьер на основе лектина

***Alternaria alternata* ВКПМ F-2039**

1. Получение посевного материала осуществляется постадийным увеличением массы продуцента: исходная культура продуцента, затем маточная культура, выращенная в колбах, следующий этап – посевная культура, выращенная в инокуляторе, затем выращенная в посевном аппарате. Первый этап получения посевного материала проходил на твердой картофельно-глюкозной

среде (картофельный отвар – 200 г/л; глюкоза – 20 г/л; pH 6,8), затем пересев на жидкую питательную среду, с последующим увеличением объема. Следующий этап – получение инокулята необходимого объема. Необходимый объем рассчитывали из соотношения 10 % к объему питательной среды.

2. Основное жидкофазное глубинное культивирование микромицета осуществляли на картофельно-глюкозной среде (картофельный отвар – 200 г/л; глюкоза – 20 г/л; 50 мкг/мл аспарагиновой кислоты). Культивирование проводили на питательной среде при температуре 28 °С в шейкер-инкубаторе BIOBASE BJPX-2102X. Время культивирования 6 суток (конец экспоненциальной-начало стационарной фазы роста мицелия).

3. Биомассу мицелия гриба отделяли от культуральной жидкости путем фильтрации с помощью промышленной ткани (полиэтилентерефталат) для лабораторного биопроцессинга фирмы «АкваАналитикс Техника», с последующим удалением остатков культуральной жидкости многократным промыванием мицелия стерильной дистиллированной водой, а затем 20 мМ Tris-HCl буферным раствором (pH 7,2).

4. Извлечение мицелиальных лектинов проводили с помощью гомогенизации мицелия на размольной гарнитуре («ESSA») при комнатной температуре, в том же растворе буфера в соотношении 1:1 (масса/объем). Полученную однородную массу оставляли при перемешивании в течение 2-3 ч при 4 °С. Удаление осадка проводили центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин. Полученные супернатанты проверяли на наличие лектинов с помощью реакции гемагглютинации с эритроцитами 1 группы крови человека.

В результате получен препарат лектинов *A. alternata* с титром активности гемагглютиниана 2048 ед.

Далее исходный раствор препарата разводили Трис-HCl буфером (pH 7,2) в концентрациях необходимых для исследований.

2.13 Определение токсичности и мутагенной активности препарата Барьер

Данный тест проводится на определения токсичности выделенного препарата и с целью подбора оптимальных (нетоксичных для тестерного микроорганизма) концентраций исследуемого соединения для их дальнейшего использования в тесте по оценке мутагенной активности (тест Эймса). В тесте на токсичность в качестве тестерного был использован штамм *S. typhimurium* TA100.

В пробирки с 3 мл растопленного 0,6 % LB-агара вносили 0,1 мл бактериальной суспензии тестерного штамма нужного разведения (10^{-7}) и 0,1 мл исследуемого раствора. Раствор перемешивали и наслаивали на 2 % LB – агар в чашки Петри. В негативный контроль вместо исследуемого вещества добавляли 0,1 мл растворителя (фосфатно-солевой буфер). Через 24 ч инкубации при 37 °С подсчитывали число колониобразующих единиц (КОЕ) в опытных и контрольных чашках Петри. Для оценки токсичности экстрактов использовали критерий «выживаемость»:

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{Число КОЕ / чашка в опыте}}{\text{Число КОЕ / чашка в контроле}} \cdot 100$$

Исследуемые образцы считаются нетоксичными, если выживаемость бактерий при их воздействии составляет ≥ 50 %.

2.14 Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)

Тест Эймса позволяет оценить мутагенный потенциал исследуемых факторов по индукции генных мутаций в тестерных штаммах бактерий [191]. В работе в качестве тестерных были использованы штаммы *S. typhimurium* TA100 и TA98, которые являются ауксотрофами по гистидину за счет точечной мутации в гистидиновом опероне. При действии мутагенных факторов тестерный штамм

TA100 ревертирует к прототрофности путем замены пар оснований, а штамм TA98 – за счет генных мутаций по типу сдвига рамки считывания.

В тесте использовалась селективная среда, на которой способны расти только прототрофные по гистидину мутанты данных штаммов. Без внешних воздействий мутации происходят достаточно редко. Добавление же в среду мутагена увеличивает частоту мутаций, что регистрируется по увеличению числа колоний His⁺ ревертантов, выросших на селективной среде.

Постановку эксперимента проводили по методу, предложенному Д.М. Мароном и В.Н. Амесом [191].

В негативном контроле в слой верхнего агара добавляли 0,1 мл растворителя (PBS). В позитивный контроль вносили 0,1 мл раствора мутагена – азида натрия (2 мкг/чашка) или 2-нитрофлуорена (10 мкг/чашка). После полного застывания агара чашки инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Далее подсчитывали число колоний-ревертантов (His⁺), выросших при действии исследуемых образцов и в негативном контроле.

Исследуемые вещества расцениваются как мутагенные, если число колоний-ревертантов, выросших при действии исследуемого вещества, достоверно превышает число колоний-ревертантов в негативном контроле более чем в 2 раза [192].

Мутагенную активность препарата Барьер выражали в величинах МИ (мутагенного индекса), который был определен как отношение среднего количества колоний бактерий на чашке в опыте (Барьер) к контролю (Tris-HCl буфер). Значения мутагенного индекса от 1,8 (для штамма TA100), 2 (для штамма TA98) говорит об отсутствии мутагенного эффекта [193].

2.15 Определение температуры и рН-значений активности и устойчивости препарата Барьер

Температурный оптимум препарата Барьер и его термостабильность изучали по гемагглютинирующей активности лектина в 20 мМ Tris-HCl буфере (рН 7,2), по методу, представленному в ранее проведенной работе [119].

Определение рН-оптимума активности препарата Барьер и его термостабильность изучалась по методу, предложенному в работах Синга с соавторами [187].

Активность лектина препарата Барьер выражали в виде процента относительной активности. Время полуинактивации лектина была определена как время и температура, при которой сохранялась половина активности лектина.

2.16 Определение влияния ионов металлов на активность препарата Барьер

Устойчивость препарата Барьер к ионам металлов, в том числе тяжелых металлов, определяли методом предложенным АльСамана с соавторами [194].

В качестве солей металлов использовали растворы $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl , $ZnSO_4$, $FeSO_4$, от 1,25 мМ до 20 мМ на основе 20 мМ Tris-HCl буферного раствора (рН 7,2). Реакционная смесь состояла из 0,025 мл растворов солей металлов различной концентрации и 0,025 мл лектина. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем определяли гемагглютинирующую активность препарата Барьер. Контролем служила активность лектина препарата Барьер в стандартных условиях в отсутствии ионов металлов.

2.17 Определение влияния NaCl на активность препарата Барьер

Солеустойчивость препарата Барьер определяли стандартным методом

[180]. Реакционная смесь состояла из 0,025 мл лектина и 0,025 мл растворов NaCl начиная от 0,5 % до 1,0 %. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем у препарата Барьер определяли гемагглютинирующую активность. Контролем служила активность лектина препарата Барьер в стандартных условиях, в отсутствии NaCl.

2.18 Определение концентрации белка

Определение концентрации белка проводили двумя методами: спектрофотометрическим методом на Lambda 35 (Perkin Elmer, США) при 260 нм и 280 нм [195]. Расчет концентрации белка осуществляли по стандартной формуле Калькара:

$$\text{Содержание белка} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \text{ (мг/мл)},$$

а также по методу Брэдфорда [196]. Метод основан на определении белка с помощью красителя Кумасси. В данном варианте опытов содержание белка определяли по калибровочной кривой, построенной для БСА (бычьего сывороточного альбумина).

2.19 Влияние препарата Барьер на рост и развитие микроорганизмов

Определение антибактериальной активности препарата Барьер проводили при глубинном культивировании штаммов бактерий на жидкой питательной среде МПБ [197]. В качестве инокулята использовали суспензии 24-часовой культуры бактерии. В качестве тест-культур были использованы штаммы фирмикутных и грациликутных бактерий *Arthrobacter agilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas fluorescens*.

Внесение препарата Барьер в концентрации 80 мкг/мл в среду культивирования бактерий осуществляли при засеве культуры. В контрольные

варианты к тест-культурам вместо препарата Барьер вносили 20 мМ Tris-HCl буфер (pH 7,8).

Анализ тест-культур в опытных и контрольных вариантах проводили по мере их роста в течение 30 ч на спектрофотометре Lambda 35 («Perkin Elmer», США) при длине волны $\lambda=570$ нм.

2.20 Определение действия препарата Барьер в полевых условиях на зерновые и бобовые культуры

Эксперименты по определению действия препарата Барьер в полевых условиях проводили с учетом методических основ и рекомендаций по проведению полевых опытов, разработанных для кормовых культур [198].

2.21 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических значений и их стандартных ошибок, используя стандартный пакет программ Microsoft Office Excel 2013. Достоверность разницы между сравнимыми величинами оценивали по критерию Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при доверительной вероятности 95 % ($p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ЛЕКТИНОВ И РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ЕГО ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОДУКЦИИ

Несмотря на значительный интерес, который проявляют исследователи разных стран к изучению лектинов микромицетов, для многих из них до сих пор не установлена способность к синтезу данных соединений, несмотря на их высокую потенциальную возможность.

3.1 Выделение активного продуцента лектинов из природных объектов

Первоначально нами была поставлена задача проанализировать микромицеты рода *Alternaria* на потенциальную способность образовывать лектины и выявление наиболее активного продуцента.

В работе использовали штаммы микромицетов Всероссийской коллекции микроорганизмов *A. alternata* F-1120 и *F. oxysporum* F-137, штаммы микромицетов *A. alternata* 7.2/8, *A. solani* 7.3/4 и *A. infectoria* 7.3/2, музея культур кафедры биотехнологии Первого государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, а также изоляты четырех штаммов микромицетов рода *Alternaria*, выделенных из образцов почвы, с клубней картофеля и зерна пшеницы. Штаммы микромицетов (*F. oxysporum* ВКМ F-137 и *F. solani* 6), музея культур кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, использовали в качестве положительного контроля, для сравнения способности микромицетов к синтезу лектинов.

Выделение чистых изолятов грибов рода *Alternaria* из природных источников проводили методом истощающего штриха грибковой суспензии на твердой питательной среде. Схема получения изолятов грибов рода *Alternaria* (рисунок 3.1).

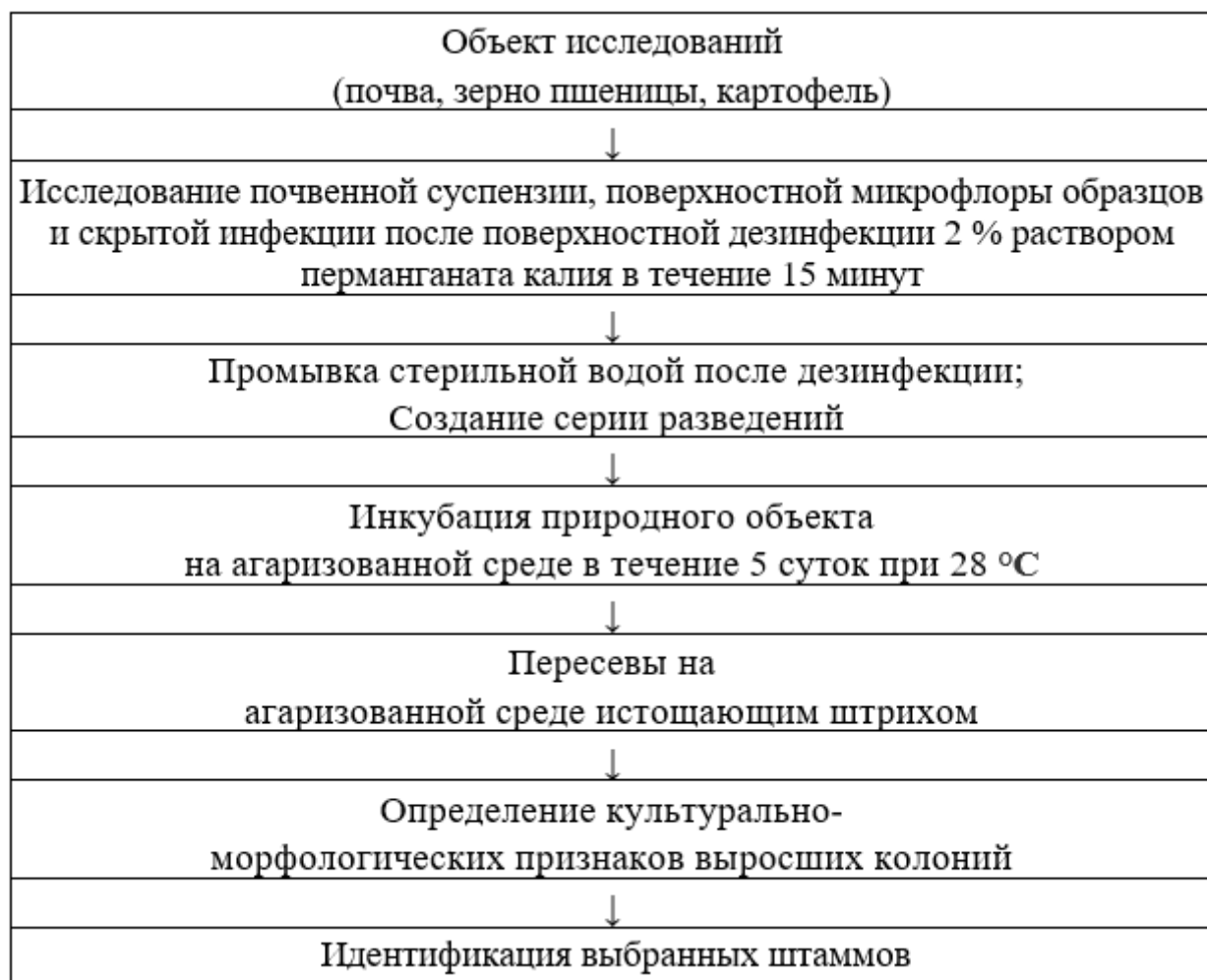


Рисунок 3.1 – Схема выделения чистых культур микромицетов рода *Alternaria*

Плотные колонии, практически без воздушного мицелия или с умеренным воздушным мицелием, имеющим зеленовато-серый, темно-серый, темно-оливковый или черный цвет, обладающим интенсивным спороношением, анализировали под микроскопом. Конидий исследуемых изолятов был представлен длинными одноцепочечными или ветвящимися цепочками, с мелкими конидиями булавовидной или яйцевидной формы, либо крупными одиночными, удлинёнными конидиями.

Полученные изоляты микромицетов, а также изоляты музейных штаммов, соответствующих микромицетам рода *Alternaria*, были исследованы на способность к синтезу эндогенных и экзогенных лектинов (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Определение титра активности лектинов у микромицетов рода *Alternaria* на 6 день культивирования (n = 5)

№	Объекты исследований	Биомасса, г/л	Титр активности лектинов	
			клеточный экстракт	культуральная жидкость
1.	<i>A. alternata</i> ВКМ F-1120	30,42±1,94	128	8
2.	<i>A. alternata</i> (коллекция, 7.2/8)	27,64±0,90	256	16
3.	<i>A. alternata</i> 1(почва)	26,54±1,60	16	2
4.	<i>A. alternata</i> 2 (почва)	28,40±0,90	16	2
5.	<i>A. alternata</i> 3(зерно)	26,82±0,89	32	16
6.	<i>A. alternata</i> 4 (зерно)	32,80±1,20	512	8
7.	<i>A. solani</i> (коллекция, 7.3/4)	30,66±0,86	128	4
8.	<i>A. solani</i> 1(картофель)	33,50±0,98	32	2
9.	<i>A. solani</i> 2 (почва)	26,84±0,80	64	4
10.	<i>A. infectoria</i> (коллекция, 7.4/2)	24,90±1,62	32	8
11.	<i>Fusarium oxysporum</i> ВКМ F-137	34,83±1,82	1024	16
12.	<i>Fusarium solani</i> (коллекция, 6)	33,64±1,62	2048	32

Все изучаемые микромицеты на 6 день культивирования на картофельно-глюкозной среде (КГС) накапливали биомассу в пределах от 24,90±1,62 до 34,83±1,82 г/л, что свидетельствует о нормальных условиях роста для данных грибов.

Определение экзогенных лектинов в культуральной жидкости показало, что у большинства представителей грибов рода *Alternaria*, при реакции прямой гемагглютинации с эритроцитами 1 группы крови человека, отмечалось наличие лектинов с невысоким титром активности (2-16 ед). Присутствие экзогенных и поверхностных лектинов было определено ранее у грибов родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* и других [106-109].

Эндогенные лектины, полученные из мицелия грибов, имели титр активности лектинов на один-два порядка выше, чем титр активности экзогенных лектинов. Наиболее высокий титр активности лектинов был определен у изолята *A. alternata* 4, который составил 512 ед. и у *A. alternata* 7.2/8 – 256 ед. Меньшую активность проявляли лектины музейных изолятов – *A. solani* 7.3/4 и *A. alternata* ВКМ F-1120 – 128 ед.

Более высокий титр активности мицелиальных лектинов, по сравнению с экзогенными лектинами, был установлен также и для других микромицетов, например, для *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerospora* [101-105]. Однако титр активности эндогенных лектинов грибов рода *Alternaria* был ниже титра активности эндогенных лектинов грибов рода *Fusarium* (таблица 3.1).

Чувствительность метода прямой гемагглютинации для определения титра активности лектинов грибов рода *Alternaria* было решено повысить модификацией поверхности эритроцитов, с помощью ферментов: трипсином, нейраминидазой и протеазой, рекомендованных в работе Бхари с соавторами, для определения титра активности лектинов грибов рода *Fusarium* [186].

Проведенная модификация поверхности эритроцитов крови 1 группы человека перечисленными ферментами приводила к повышению гемагглютинирующей активности эндогенных лектинов грибов рода *Alternaria* (рисунок 3.2).

Обработка эритроцитов трипсином повышала гемагглютинирующую активность эндогенных лектинов грибов рода *Alternaria* в 2-4 раза. Более значительное повышение титра активности лектинов наблюдалось у природных изолятов *A. alternata* 2, *A. alternata* 3, *A. solani* 2, имеющих низкую активность при взаимодействии с нативными эритроцитами. Для лектинов других изолятов титр активности лектинов повышался в 2 раза. Гемагглютинирующая активность лектина изолята *A. alternata* 4 повышалась в 2 раза, но она оставались выше других изучаемых грибов.

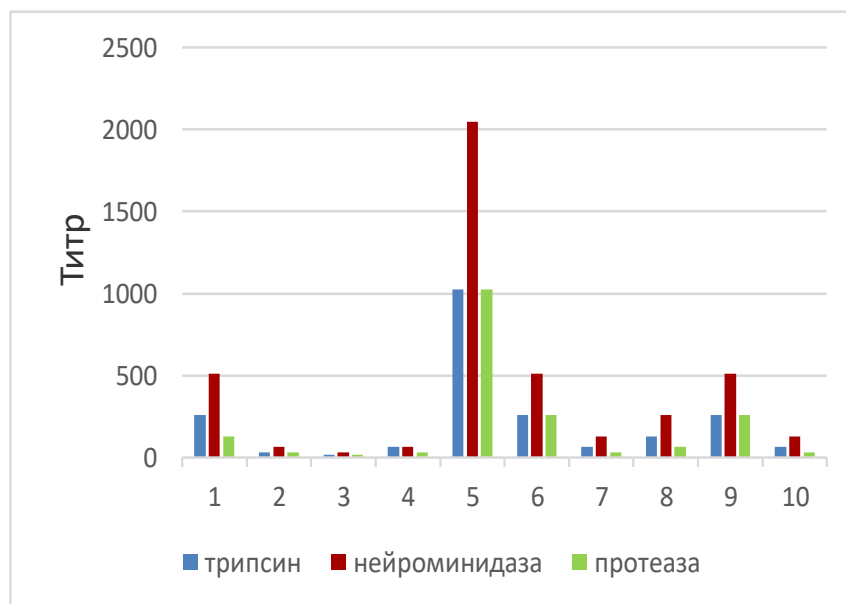


Рисунок 3.2 – Эффективность модификации эритроцитов 1 группы крови человека ферментами: трипсином, нейроминидазой и протеазой, для повышения чувствительности реакции гемагглютинации по определению титра активности лектинов изолятов микромицетов: 1 – *A. alternata* ВКМ F-1120, 2 – *A. alternata* 1; 3 – *A. alternata* 2 (почва), 4 – *A. alternata* 3 (зерно), 5 – *A. alternata* 4 (зерно), 6 – *A. solani* (коллекция, 7.3/4) 7 – *A. solani* 1 (картофель), 8 – *A. solani* 2 (почва), 9 – *A. alternata* (коллекция, 7.2/8), 10 – *A. infectoria* (коллекция, 7.4/2)

Обработка поверхности эритроцитов нейрамнидазой повысила чувствительность реакции гемагглютинации более значительно (в 2-8 раз). Титр активности лектинов повышался у всех изучаемых изолятов. У природных изолятов, *A. alternata* 2 и *A. alternata* 3, данная обработка ферментом увеличивала агглютинирующую активность лектинов – в 8 раз. У изолята *A. alternata* 4 титр активности лектина повышался в 4 раза, но оставался на порядок выше других грибов (2048 ед.).

При обработке эритроцитов протеазой чувствительность реакции

гемагглютинации повышалась незначительно. В данном варианте опытов титр активности лектинов повышался в 2 раза у изолятов *A. alternata 1*, *A. alternata 2*, *A. alternata 3*, *A. solani 7.3/4*. Титр активности изолята *A. alternata 4* оставался на уровне контроля (512 ед.).

Скрининг грибов рода *Alternaria*, показал, что наиболее активный изолят, способный к синтезу лектинов - штамм *A. alternata 4*, полученный с зерна пшеницы. Данный продуцент, синтезирующий активные лектины, был исследован нами с помощью молекулярно-генетического анализа.

3.2. Молекулярно-генетическое определение видовой принадлежности выделенного штамма

Для подтверждения данных морфологической идентификации наиболее активного продуцента лектинов изолята микромицета, полученного с зерна пшеницы использовался метод Сэнгера, который подтвердил, что выделенный изолят является микромицетом *A. alternata*. Для изолята получена последовательность из 285 олигонуклеотидов гена ITS-региона рДНК и 385 олигонуклеотидов кодирующей области синтеза β -тубулина (рисунок 3.3 и 3.4).

Филогенетический анализ, выполненный на основе последовательностей ITS-региона рДНК и гена *tub2*, с использованием данных базы GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) показал, что исследуемый штамм кластеризуется с референсными последовательностями микроскопического гриба вида *A. alternata*. Как показано на рисунке 3.5 и 3.6, он располагается внутри кластера, образованного последовательностями данного вида, что свидетельствует о его филогенетической близости и позволяет отнести изучаемый изолят к *Alternaria alternata*.

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
 CCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTA
 CAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGG
 TTCGCCCACCACTAGGACAAACATAAACSTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAA
 CAAATTAATAATTACAACSTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
 AACGCAGCAA

Рисунок 3.3 – Последовательность олигонуклеотидов области, кодирующей 5.8S рРНК выделенной культуры микромицета *A. alternata* 4

TGTGCACSTTTCCGACCGGCCAGTGCGTAAGCTCTTCTCTCCTCAAACATCC
 AGACGAAGCTAATAGTGTTTTCAGGGTAACCAAATCGGTGCTGCCTTTTGGCAGA
 CCATCTCCGGCGAGCATGGCCTCGACGGCTCTGGTGTCTACAACGGCACTTCAGAC
 CTCCAGTTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAAGTACGTCACTCGATATTTCCA
 TACGGCAGATAAAAGGCCAATACTGATCTATAGCAGGCGTCCAACAACAAGTTCCG
 TGCCCCGTGCCGTCCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGCGCT
 GGTCCCTTCGGCCAGCTGTTCCGCCCTGACAACSTTCGTCTTGGCCAAATCCGGA

Рисунок 3.4 – Последовательность олигонуклеотидов части гена, кодирующего β-тубулин выделенной культуры микромицета *A. alternata* 4



Рисунок 3.5 – Филогенетическое древо на основе ITS-региона рДНК



Рисунок 3.6 – Филогенетическое древо на основе гена *tub2*

Таким образом, совокупность результатов молекулярно-генетического анализа подтверждает видовую принадлежность штамма к виду *A. alternata* [199].

Новый производственный штамм зарегистрирован в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», с присвоением номера F-2039 (Приложение А).

ГЛАВА 4. ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ РОСТА *ALTERNARIA ALTERNATA* ВКПМ F-2039 И ПРОИЗВОДСТВА АКТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ

Скорость роста продуцента и синтез им биологически активных веществ во многом зависит от состава питательных сред [168,180]. На основе данных литературы были выбраны наиболее известные среды: КГС, среда Чапека, среда Сабуро, среда Кэра и картофельно-морковная среда, которые наиболее широко используются для роста и метаболизма микромицетов, в том числе, микромицетов рода *Alternaria*. В таблице 4.1 приведен углеводный состав и содержание в питательных средах [200].

Таблица 4.1 – Содержание в питательной среде углеводов, пептона и дрожжевого экстракта, г/л

Углеводы	КГС	Среда Чапека	Среда Сабуро	Среда Кэра	Картофельно-морковная среда
Моносахариды:					
глюкоза	30,0	-	30,0	-	20,0
фруктоза	0,20	-	-	-	0,10
Олигосахариды:					
сахароза	0,12	30,0	-	30,0	0,90
Полисахариды:					
крахмал	26,0	-	-	-	14,0
Пептон	-	-	10,0	-	-
Дрожжевой экстракт	-	-	-	1,0	-

Установлено, что КГС содержит в своем составе наибольшее количество моносахаридов, крахмала и других углеводов. Близка по составу к КГС и картофельно-морковная среда. Углеводной основой сред Чапека и Кэра является дисахарид – сахароза. Известно, что многие микромицеты содержат в своем составе амилолитические ферменты, которые позволяют расти грибам на данных средах. Все перечисленные источники углерода обеспечивают микромицеты необходимой энергией и углеводным питанием.

Эксперименты показали, что на всех питательных средах уже на 2 день культивирования гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 наблюдается помутнение питательной среды, что свидетельствует о накоплении биомассы. В качестве критерия оценки роста микромицета на выбранных питательных средах мы использовали весовой показатель накопления биомассы (рисунок 4.1).

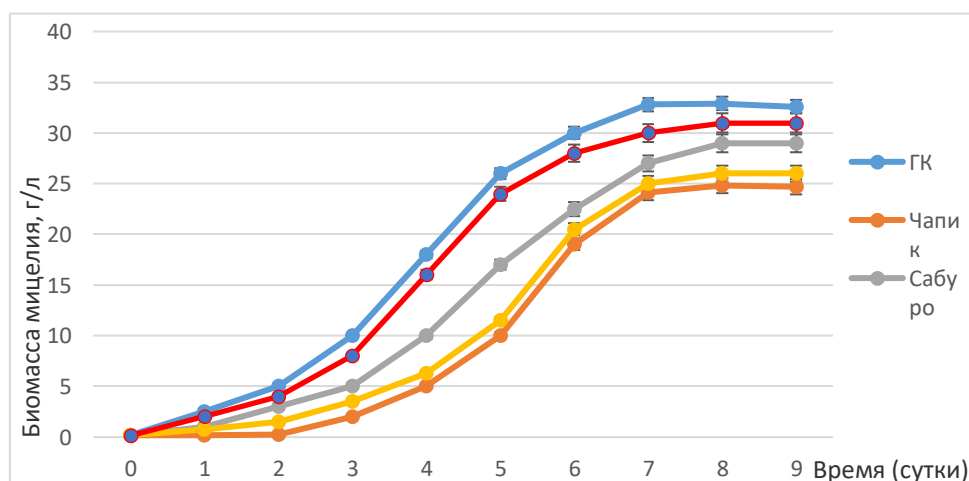


Рисунок 4.1 – Кинетика роста *A. alternata* ВКПМ F-2039 на различных питательных средах

Лучший рост гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 наблюдался на КГС. Продолжительность логарифмической фазы роста гриба на данной среде была на 2 дня меньше по сравнению с ростом гриба на других средах. Кроме того биомасса гриба на период стационарной фазы роста на среде КГС была выше показателей биомассы на среде Сабуро, Кэра и Чапека в 1,1-1,3 раза, соответственно.

Максимальные показатели накопления биомассы *A. alternata* ВКПМ F-2039 наблюдались на среде КГС и составили $32,8 \pm 1,2$ г/л. Данные результаты соответствуют показателям максимального роста микромицетов рода *Alternaria* на картофельно-глюкозной среде в ряде других работ [168]. На перечисленных

выше средах в период стационарной фазы роста культуры изучали синтез лектинов (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Накопление биомассы *A. alternata* ВКПМ F-2039 на разных питательных средах и образование лектинов на 6 сутки (n = 5)

Питательные среды для культивирования	Биомасса, г/л	Титр активности
Картофельно-глюкозная среда	32,8±1,2	512
Среда Чапека	24,8±0,9	128
Среда Сабуро	29,0±1,0	64
Среда Кэра	26,2±1,2	128
Картофельно-морковная среда	31,7±1,3	256

Результаты исследований показали, что грибы *A. alternata* ВКПМ F-2039 не только лучше растут на картофельно-глюкозной среде, но и синтезируют лектины с высоким титром активности.

Таким образом, картофельно-глюкозная среда была выбрана как основная питательная среда для роста и синтеза лектинов микромицетом *A. alternata* ВКПМ F-2039. Эта же среда использовалась для длительного хранения продуцента.

Штамм продуцента хранили на КГС, объемом 20 мл, в холодильнике при температуре 4-6 °С. Для сохранения продуктивности изолята проводили, один раз в полгода, пересев гриба с определением культурально-морфологических характеристик.

4.1. Определение временного периода для получения биологически активных лектинов

Для повышения продукции и титра активности лектинов мицелиальными грибами рода *Alternaria* были проведены опыты, устанавливающие взаимосвязь их биосинтеза, микромицетом *A. alternata* ВКПМ F-2039, в зависимости от периода роста популяции клеток и состава питательной среды.

Определение временного периода образования активных лектинов грибами рода *Alternaria* проводили при изучении кинетики роста клеток и накопления биомассы. Гриб культивировали на среде КГ, при температуре 28 °С. Отбор проб мицелия для определения роста и активности лектинов осуществляли каждые сутки, в течение 9 дней.

Результаты исследований показали, что рост продуцента активных лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 начинался с первых суток культивирования. Через 3 суток выращивания гриба, наблюдалось начало активного деления клеток и увеличение прироста биомассы. Параллельно росту клеток, в мицелии гриба, было выявлено появление и нарастание активности лектинов. Титр активности лектинов достигал максимальных значений (512 ед.) на 6-7 сутки культивирования. Одновременный рост титра активности лектинов и увеличение биомассы отмечался у многих грибов [187, 201]. На 8-9 сутки, несмотря на сохранение показателей биомассы изолята *A. alternata* ВКПМ F-2039 на уровне $32,8 \pm 1,2$ г/л, титр активности лектинов снижался в 2-4 раза ($p = 0,028$) (рисунок 4.2).

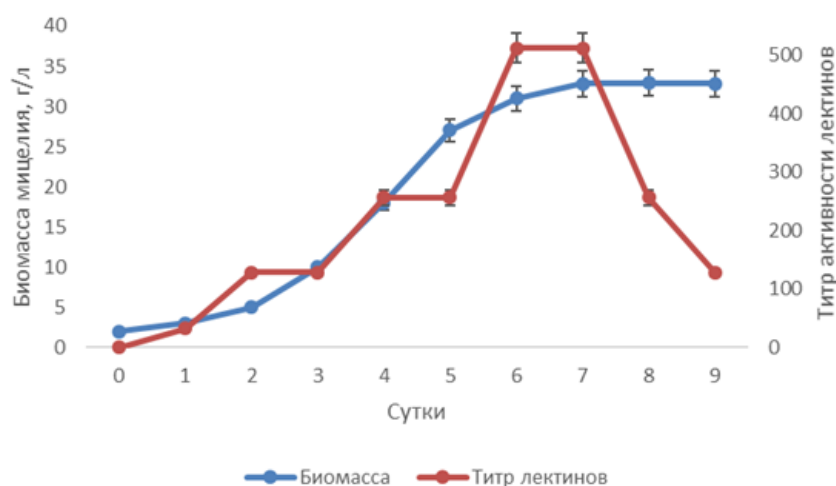


Рисунок 4.2 – Кинетика роста и образования лектинов продуцентом *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

Результаты исследования показали, что максимальные значения активности лектинов микромицетов не находятся в прямой зависимости от накопления биомассы, но зависят от фазы роста популяции клеток микромицетов. Максимальные значения титра активности лектинов соответствуют концу экспоненциальной фазы роста гриба. Следует отметить, что точное определение временного периода максимальной активности лектинов позволяет получить их со значительно более высоким титром, по сравнению с другим временным периодом роста гриба.

4.2 Определение влияния отдельных компонентов питательной среды и эффективных добавок, для получения биологически активных лектинов

Изучая образование лектинов, можно было предположить, что титр активности лектинов в той или иной степени зависит от состава питательной среды, основой которой для гетеротрофов являются органические соединения (главным образом – углеводы). Именно углеводы в значительной степени влияют не только на рост микроорганизмов, но и образование ими продуктов метаболизма.

Среди источников углеродного питания, рост и образование активных лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 было изучено на глюкозе, сахарозе и крахмале (таблица 4.3).

Наиболее активный рост *A. alternata* ВКПМ F-2039 и накопление лектинов наблюдалось в среде с картофельным отваром, с добавлением глюкозы в различных концентрациях. При концентрации глюкозы 20,0 г/л вес биомассы составил $(32,8 \pm 1,2$ г/л), титр активности лектинов – (512 ед.) (табл. 4.3). Снижение в питательной среде концентрации глюкозы до 15,0 г/л приводило к снижению роста биомассы в 1,4 раза $(23,4 \pm 1,4$ г/л, $p = 0,025$) и титра активности лектинов в 2 раза (256 ед., $p = 0,028$). Повышение в питательной среде концентрации глюкозы

до 30,0 г/л увеличивало рост микроорганизмов в 1,1 раз ($35,0 \pm 1,1$ г/л, $p = 0,018$), однако синтез лектинов, оставался на том же уровне, что и при концентрации глюкозы 20,0 г/л (512 ед., $p = 0,012$).

Рост микромицета на питательной среде с сахарозой в концентрации 15,0 г/л составил $21,8 \pm 1,2$ г/л, что было в 1,1-1,2 раза меньше ($p = 0,024$), чем рост микромицета на среде с глюкозой при данной концентрации ($23,4 \pm 1,4$ г/л). Титр активности лектинов, при концентрации сахарозы 15,0 г/л, также снижался и был в 4 раза ниже (128 ед., $p = 0,039$), чем на глюкозе при данной концентрации.

При внесении в питательную среду сахарозы в концентрации 20,0 г/л, количество биомассы составило $30,7 \pm 1,6$ г/л, а при 30 г/л – $32,6 \pm 1,4$ г/л, что в 1,1 раз меньше, чем на глюкозе в концентрации 20,0-30,0 г/л ($p = 0,041$ и $p = 0,022$ соответственно). При данных концентрациях активность лектинов снижалась в 2 раза по сравнению с глюкозой и составила 256 ед. ($p = 0,028$).

Рост гриба наблюдался и при дополнительном внесении в картофельный отвар крахмала. Однако, активность лектинов при самых высоких показателях биомассы мицелия $22,7 \pm 1,6$ г/л (концентрация крахмала 10 г/л) снижалась в 8 раз ($p = 0,035$), по сравнению с титром активности лектинов на глюкозе при концентрации 20,0 г/л (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Влияние источников углерода на выход биомассы и активность лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039, на 6 день культивирования ($n = 5$)

Продуцент	Источник углерода	Концентрация углевода, г/л	Биомасса мицелия, г/л	Титр лектинов
A. alternata ВКПМ F- 2039	Глюкоза	15	$23,4 \pm 1,4$	256
		20	$32,8 \pm 1,2$	512
		30	$35,0 \pm 1,1$	512
	Сахароза	15	$21,8 \pm 1,2$	128
		20	$30,7 \pm 1,6$	256
		30	$32,6 \pm 1,4$	256
	Крахмал	5	$18,5 \pm 1,2$	8
		10	$22,7 \pm 1,6$	32
		15	$20,5 \pm 1,4$	16

Кроме углеродного питания значительное влияние на рост микроорганизмов оказывает присутствие в питательной среде источников азота. Представляло интерес, как внесение источников азотного питания в среду культивирования микромицета отразится на синтезе лектинов. В наших экспериментах мы изучали внесение в питательную среду КГ органических и неорганических источников азота: пептона, нитрата аммония, нитрата натрия и сульфата аммония в концентрациях 1-2 г/л (таблица 4.4).

Результаты исследований показали, что внесение в питательную среду культивирования микроорганизмов пептона, как дополнительного источника питания, способствует росту клеток в периодической культуре, что соответствует данным литературы [202]. При концентрации пептона 1,0 г/л биомасса мицелия увеличивалась до $34,6 \pm 1,4$ г/л ($p = 0,042$), а при 2,0 г/л - до $36,8 \pm 1,6$ г/л ($p = 0,018$), что соответствует приросту в 1,1-1,2 раза по сравнению с контролем ($32,8 \pm 1,2$ г/л). Однако синтез гликопротеина (лектина) в данных условиях значительно угнетался: титр активности снижался с 512 ед. в контроле до 32 ед. ($p < 0,001$) и 64 ед. ($p < 0,001$) соответственно, то есть в 8-16 раз.

Таблица 4.4 – Влияние источников азотного питания на выход биомассы и активность лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 на 6 день культивирования ($n = 5$)

Продуцент	Источники азота, г/л	Концентрация источников азота, г/л	Биомасса мицелия, г/л	Титр лектинов
<i>A. alternata</i> ВКПМ F-2039	Пептон	1,0	$34,6 \pm 1,4$	32
		2,0	$36,8 \pm 1,6$	64
	NaNO ₃	1,0	$31,6 \pm 1,0$	128
		2,0	$27,3 \pm 1,2$	128
	NH ₄ NO ₃	1,0	$30,4 \pm 1,4$	64
		2,0	$27,3 \pm 1,1$	32
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	$30,8 \pm 1,4$	64
		2,0	$26,8 \pm 1,3$	32
	Контроль	-	$32,8 \pm 1,2$	512

Это можно объяснить тем, что азот, ингибируя, по-видимому, синтез углеводной части лектина, снижает процесс его образования. Отрицательное действие азота на синтез полисахаридов отмечалось и в других работах [203].

Негативное действие на синтез лектинов оказывают также соли неорганического азота. Однако если в состав пептона входят компоненты, способствующие росту клеток, то внесение неорганического азота не увеличивает прирост биомассы. При внесении в питательную среду NaNO_3 в концентрации 1,0 г/л биомасса мицелия составила $31,6 \pm 1,0$ г/л ($p = 0,12$), а при 2,0 г/л снижалась до $27,3 \pm 1,2$ г/л ($p = 0,008$), что соответствует уменьшению ее количества в 1,0-1,2 раза. При этом титр активности лектинов при данных концентрациях снижался в 4 раза (128 ед., $p = 0,003$) по сравнению с контролем. Внесение в питательную среду NH_4NO_3 или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ также снижало накопление биомассы мицелия. При внесении в питательную среду NH_4NO_3 или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации 2,0 г/л, биомасса мицелия составила $27,3 \pm 1,1$ г/л ($p = 0,007$) и $26,8 \pm 1,3$ г/л ($p = 0,006$) соответственно. В данном варианте опытов активность лектинов при концентрации в питательной среде нитрата аммония или сульфата аммония 1,0-2,0 г/л снижалась в 8-16 раз (32 ед., $p < 0,001$) по сравнению с контролем. Снижение биомассы и активности лектинов было статистически значимо ($p < 0,05$).

Основным элементом структуры лектинов является белок, поэтому в следующей серии опытов мы изучали влияние аминокислот в качестве дополнительных факторов роста биомассы и биосинтеза лектинов грибом *A. alternata* ВКПМ F-2039 (таблица 4.5).

Результаты исследований показали, что дополнительное внесение аминокислот в питательную среду культивирования *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 по-разному влияет на прирост биомассы гриба. Так, внесение в питательную среду аспарагиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл повышало биомассу мицелия до значений $36,2 \pm 1,1$ г/л ($p = 0,022$), что в 1,1 раз выше показателей

контроля ($32,8 \pm 1,2$ г/л). При увеличении концентрации аспарагиновой кислоты до 100 мкг/мл рост биомассы менялся до значений $33,8 \pm 1,0$ г/л ($p = 0,18$), что было несколько выше значений контроля, но не было статистически значимо.

Таблица 4.5 – Биомасса мицелия и титр активности лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 при дополнительном внесении аминокислот в питательную среду культивирования на 6 день культивирования ($n = 5$)

Аминокислоты	Концентрация аминокислот, мкг/мл	Биомасса мицелия, г/л	Титр активности лектинов
Аспарагиновая кислота	50	$36,2 \pm 1,6$	2048
	100	$33,8 \pm 1,4$	2048
Аргинин	50	$29,8 \pm 1,2$	1024
	100	$28,6 \pm 1,2$	512
Глицин	50	$32,6 \pm 1,6$	512
	100	$30,0 \pm 1,4$	1024
Цистеин	50	$27,6 \pm 1,4$	512
	100	$22,8 \pm 1,2$	256
Треонин	50	$33,2 \pm 1,6$	512
	100	$34,4 \pm 1,8$	1024
Триптофан	50	$30,8 \pm 1,2$	512
	100	$33,4 \pm 1,4$	512
Контроль	-	$32,8 \pm 1,2$	512

Изменения биомассы мицелия при добавлении в питательную среду глицина в концентрации 50 мкг/мл составило $32,6 \pm 1,2$ г/л ($p = 0,75$); при концентрации 100 мкг/мл соответствовало значениям $30,0 \pm 1,0$ г/л ($p = 0,035$); при внесении треонина, в концентрации 50 мкг/мл $33,2 \pm 1,3$ г/л ($p = 0,55$), а при концентрации 100 мкг/мл соответственно $34,4 \pm 1,2$ г/л ($p = 0,12$); при внесении триптофана, в концентрации 50 мкг/мл, значения биомассы было $30,8 \pm 1,1$ г/л ($p = 0,025$), а при 100 мкг/мл соответствовали значениям $33,4 \pm 1,0$ г/л ($p = 0,42$), что не превышало погрешность измерений. В случае внесения в питательную среду цистеина в концентрации 50 мкг/мл или 100 мкг/мл наблюдалось статистически значимое снижение биомассы до $27,6 \pm 1,1$ г/л ($p = 0,005$) и до $22,8 \pm 1,0$ г/л ($p <$

0,001), что соответствовало уменьшению биомассы мицелия в 1,2-1,4 раза по сравнению с контролем.

При дополнительном внесении аминокислот в среду культивирования, в большинстве вариантов опытов, титр активности лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 достоверно повышался. Добавление аспарагиновой кислоты (50-100 мкг/мл) увеличивало титр активности до 2048 ед. ($p < 0,001$), что в 4 раза превышало контрольные значения (512 ед.). Для других аминокислот также наблюдалось значимое увеличение активности: аргинин (50 мкг/мл) – до 1024 ед. ($p = 0,003$), глицин (100 мкг/мл) – до 1024 ед. ($p = 0,003$), треонин (100 мкг/мл) – до 1024 ед. ($p = 0,003$), что соответствовало 2-кратному повышению титра активности лектинов по сравнению с контролем, однако соответствующие значения биомассы при этом не превышали погрешность измерений. Исключением стал цистеин (100 мкг/мл), снижавший как биомассу, так и активность лектинов до 256 ед. ($p = 0,008$), т.е в 2 раза по сравнению с контролем.

Проведенные исследования позволяют сделать общее заключение, что синтез лектинов микромицетами рода *Alternaria* зависит от многих факторов, включая период роста популяции клеток, физиологическое состояние, состав питательной среды. Нами была установлена связь между ростом, накоплением биомассы мицелия и синтезом лектинов микромицетом *A. alternata* ВКПМ F-20394, однако данная связь носит непрямой характер, поскольку увеличение биомассы не всегда способствует увеличению титра активности лектинов. Особенно четко это положение подтверждается результатами опытов при дополнительном внесении в среду культивирования гриба пептона, когда увеличение концентрации пептона достоверно увеличивало биомассу (в 1,2 раза), но титр активности лектинов снижался в 8-16 раз по сравнению с контролем. Негативное действие на синтез лектинов азота подтверждается и при внесении в среду культивирования *A. alternata* ВКПМ F-2039 неорганического азота, в виде нитрата аммония и сульфат аммония.

Синтез лектинов связан с делящимися клетками, поскольку рост титра активности лектинов начинается в период экспоненциальной фазы роста мицелия, увеличивается по мере роста числа делящихся клеток и снижается в период их уменьшения. Максимальная активность лектинов наблюдается на 6-7 сутки культивирования гриба, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста микромицета. Такая закономерность установлена для микромицетов и других родов [187, 201].

Наиболее активное деление клеток и рост биомассы гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 происходит на глюкозе. Именно на среде с глюкозой наблюдался и самый высокий титр активности лектинов (512 ед) по сравнению с другими углеводами (сахароза, крахмал). Увеличение продукции лектинов микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 возможно при дополнительном внесении в питательную среду аминокислот, особенно при внесении аспарагиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл. Активность лектинов в данном варианте опытов повышалась в 4 раза по сравнению с контролем. Можно предположить, что аспарагиновая кислота участвует в синтезе лектинов, поскольку ее высокое содержание в составе лектинов микромицетов отмечалось в работах Кфана с соавторами [204].

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКТИНА *ALTERNARIA ALTERNATA* ВКПМ F-2039 И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЕГО СПОСОБНОСТИ К ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ПАТОГЕНОВ

Анализируя литературу, посвященную изучению лектинов различных организмов, можно отметить, что значительная часть данных исследований направлена на изучение действия этих соединений на различные процессы, но, в основном, связанные с медицинским направлением. Работ, посвященных изучению действия лектинов в сельском хозяйстве, растениеводстве, значительно меньше. Однако данное направление также заслуживает внимания ученых.

В наших экспериментах мы изучали действие лектинов микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 на зерновые и бобовые культуры.

5.1 Определение влияния лектина гриба *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на энергию прорастания и всхожесть семян зерновых и бобовых культур

Эксперименты по определению влияния лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на энергию прорастания и всхожесть семян проводили на семенах пшеницы и гороха. Обработку семян растений проводили в растворах с лектином в течение 24 ч, с последующим распределением на поверхности увлажненной стерильной водой фильтровальной бумаги, в чашках Петри. В работе использовали лектин в концентрации 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл и 400 мкг/мл. Выбор концентраций был основан на ранее проведенных исследованиях по лектинам грибов и бактерий [205, 206]. Контролем служили образцы семян, которые замачивались в 20 мМ трис-HCl буфере (pH 7,2). В качестве дополнительного контроля при изучении ростостимулирующего действия использовали известный препарат «Циркон», состоящий из смеси

гидроксикоричных кислот в концентрации, рекомендованной производителями (100 мкг/мл) и для сравнения с лектином гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 – 10 мкг/мл.

Определение энергии прорастания устанавливали на 3 сутки после обработки семян лектином, всхожесть регистрировали через 7 дней, что соответствует принятым временным значениям для данного вида семян (таблица 5.1, 5.2).

Таблица 5.1 – Влияние лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на энергию прорастания, всхожесть семян пшеницы (n = 5)

Варианты опыта	Концентрация лектина, мкг/мл	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	-	68,5	74,0
«Циркон» (концентрация 100 мкг/мл)	-	80,0	84,3
«Циркон» (концентрация 10 мкг/мл)	-	69,0	74,6
Лектин <i>A. alternata</i> ВКПМ F-2039	5	69,4	76,3
	10	82,3	86,6
	20	81,9	87,9
	40	69,7	84,9
	80	68,2	73,8
	400	-	-

Таблица 5.2 – Влияние лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на энергию прорастания, всхожесть семян гороха (n = 5)

Варианты опыта	Концентрация лектина, мкг/мл	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	-	73,8	86,5
«Циркон» (концентрация 100 мкг/мл)	-	78,8	89,6
«Циркон» (концентрация 10 мкг/мл)	-	74,0	86,8
Лектин <i>A. alternata</i> ВКПМ F-2039	5	80,7	88,7
	10	87,8	93,9
	20	87,6	93,6
	40	86,9	91,7
	80	73,0	85,8
	400	-	-

Проведенные исследования показали положительное влияние лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на энергию прорастания и всхожесть семян как зерновых, так и бобовых культур (пшеницы и гороха), в концентрациях 5-40 мкг/мл. Лучшие результаты были получены при обработке семян пшеницы и гороха лектином в концентрации 10 мкг/мл и 20 мкг/мл, когда энергия прорастания и всхожесть семян зерновых и бобовых культур увеличивалась на 7-14 % относительно контроля. Более низкие и более высокие концентрации лектина (5 мкг/мл и 40 мкг/мл) увеличивали энергию прорастания и всхожесть семян, но в меньшей степени. Повышение концентрации лектина до 80 мкг/мл не вызывало увеличения стимулирующего действия на семена, а в концентрации (400 мкг/мл) – тормозило всхожесть. Однако ингибирующее действие лектина было обратимым: семена, промытые и помещенные в водный раствор, полностью восстанавливали свою всхожесть. Такое действие лектинов азоспирилл на семена пшеницы отмечалось в работах Никитиной с соавторами [189].

Увеличение энергии прорастания и всхожесть семян наблюдалось и при использовании стимулятора растений «Циркона» в рекомендованной концентрации 100 мкг/мл. Однако данные показатели были ниже, чем при использовании лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039. Значительные различия наблюдались при сравнении лектина микроциста и препарата «Циркон» в концентрации 10 мкг/мл. При обработке семян данной концентрацией препарата «Циркон» энергия прорастания и всхожесть семян была незначительно выше показателей контроля.

Таким образом, полученные результаты показали, что лектины *A. alternata* ВКПМ F-2039 стимулируют энергию прорастания и всхожесть семян зерновых и бобовых культур в зависимости от концентрации лектина в растворе [207, 208].

5.2 Определение влияния лектина *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на рост и развитие зерновых и бобовых культур

Для оценки влияния лектина микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 на рост и развитие растений, 3х суточные проросшие семена растений (пшеницы и гороха) обрабатывали лектином в концентрациях 5 мкг/л, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/л. Обработку вели в течение 24 ч. Контролем служили образцы проросших семян, которые замачивались в 20 мМ трис-НСI буфере (рН 7,2).

Результаты проведенных исследований показали, что обработка семян лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 оказывала положительное действие на морфометрические показатели растений (рисунок 5.1 и 5.2). Особенно эффективное действие лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 наблюдалось при обработке семян пшеницы [207].

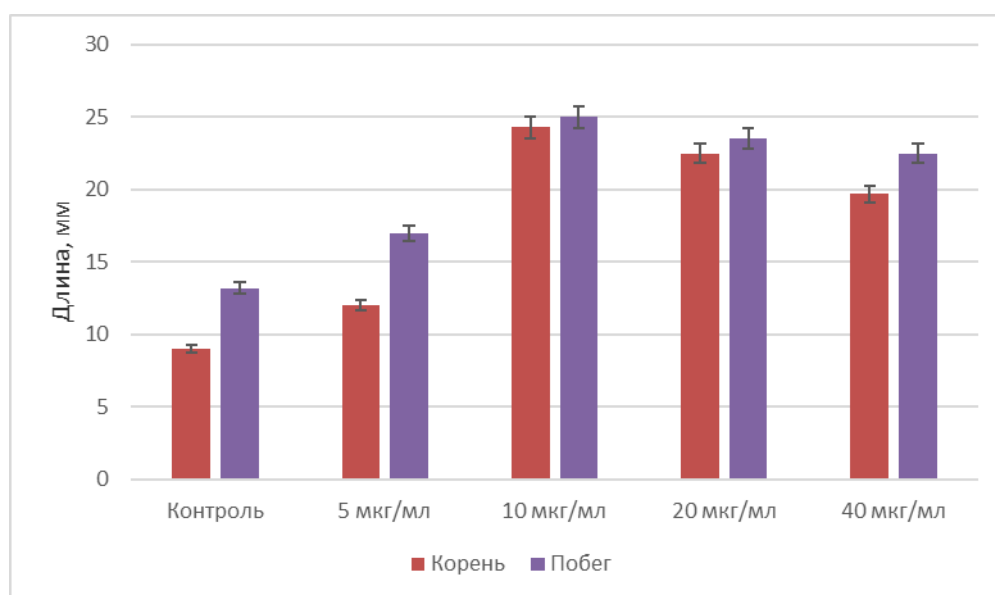


Рисунок 5.1 – Длина корней и побега на 10 день выращивания проросших семян пшеницы, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039

Обработка семян пшеницы лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 5 мкг/мл, усиливала рост корней и зародышевого побега растения в

1,3 раза по сравнению с контролем. По мере увеличения концентрации лектина до 10 мкг/мл положительный эффект был более выраженным: увеличилось количество корней и их длина (в 2,7 раз), зародышевые побеги были длиннее и утолщенные (в 1,9 раз) по сравнению с контролем. При обработке семян растений лектином в концентрации 20 мкг/мл общая картина увеличения корней и побега сохранялась (корни увеличивались в 2,5 раза, побеги – в 1,8 раз). При обработке семян растений лектином в концентрации 40 мкг/мл длина корней и побегов увеличивалась, но сохранялась на уровне соответствующей обработке семян при концентрации 20 мкг/мл (рисунок 5.1).

Такая же закономерность роста корней и побегов наблюдалась при обработке семян бобовой культуры – гороха (рисунок 5.2).

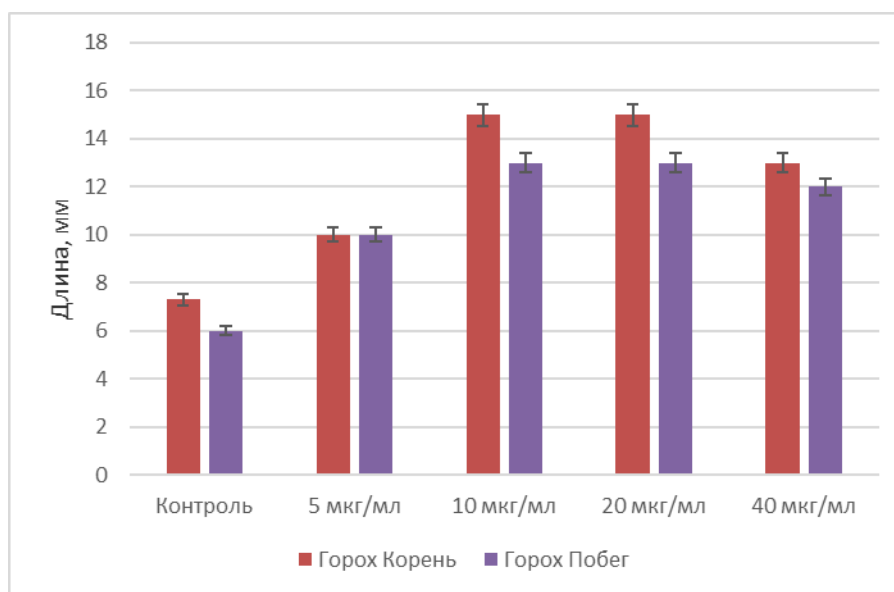


Рисунок 5.2 – Длина корней и побега на 10 день выращивания пророщенных семян гороха, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039

При обработке лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 семян гороха в концентрации 5 мкг/мл, длина корней увеличивалась в 1,4 раза, длина побегов – в 1,7 раз по сравнению с контролем, однако была меньше чем при обработке семян лектином при концентрации 10 мкг/мл. При обработке семян гороха лектином в

концентрации 10 мкг/мл и 20 мкг/мл длина корней и побегов увеличивалась в среднем в 2,0 раза. Увеличение концентрации лектина в растворе для обработки семян гороха до 40 мкг/мл не вызывало дальнейшего увеличения роста корней и побегов изучаемых растений.

В проведенных экспериментах длину корней и побегов сравнивали с показателями длины корней и побегов контрольных вариантов. В качестве дополнительных контролей действия белков на растения в работе Никитиной с соавторами [189] использовали растворы белков различной природы: агглютинина зародышей пшеницы (АЗП), фитогемагглютинина фасоли (ФГА), ферритина и зеина, в концентрациях от 1,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 50,0 мкг/мл и 500 мкг/мл. Во всех изученных концентрациях растительные лектины, а также ферритин и зеин не оказывали эффекта в выбранных концентрациях.

В наших экспериментах в качестве дополнительного контроля также изучили действие агглютинина зародышей пшеницы (АЗП), казеина и альбумина, на рост корней и побегов пшеницы и гороха (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Сравнительное действие АЗП и других белков на рост корней и побегов пшеницы по сравнению с лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (n = 3)

Варианты опыта		Длина корней и побегов пшеницы, мм			
		концентрация агглютинина и белков, мкг/мл			
		5	10	20	40
АЗП	1	9,0±0,33	8,9±0,66	8,9±0,14	8,8±0,19
	2	11,9±0,20	12,8±0,20	13,0±0,16	13,2±0,22
казеин	1	9,2±0,14	9,5±0,33	9,6±0,14	9,7±0,33
	2	13,4±0,1	13,6±0,12	13,2±0,20	13,0±0,10
альбумин	1	9,2±0,14	9,4±0,12	9,6±0,14	9,6 ±0,14
	2	13,4±0,20	13,6±0,14	13,4±0,12	13,6±0,12
лектин	1	12,0±0,12	24,3±0,20	22,5±0,12	19,7±0,14
	2	17,2±0,16	25,0±0,22	23,5±0,14	22,5±0,16

Примечание: * Длина корней и проростков пшеницы в контроле составляла 9,0±0,33 мм и 13,2±0,14 мм ($p < 0,05$); 1-корни, 2-побеги

Эксперименты показали отсутствие влияния АЗП и других изучаемых белков на рост корней и побегов пшеницы, в отличие от действия лектина, во всех изучаемых концентрациях. Такая же картина наблюдалась и при действии на семена гороха (таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Действие АЗП и белков на рост корней и побегов гороха по сравнению с лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (n = 3)

Варианты опыта		Длина корней и побегов гороха, мм			
		Концентрация агглютинина и белков, мкг/мл			
		5	10	20	40
АЗП	1	7,0±0,33	7,2±0,12	7,0±0,14	7,3±0,20
	2	6,0±0,20	5,8±0,14	6,0±0,16	6,2±0,22
казеин	1	7,2±0,12	7,3±0,26	7,6±0,14	7,7±0,33
	2	6,4±0,33	6,2±0,12	6,2±0,20	6,0±0,10
альбумин	1	7,2±0,14	7,6±0,14	7,4±0,16	7,6 ±0,14
	2	6,4±0,20	6,6±0,24	6,4±0,12	6,6±0,12
лектин	1	10,2±0,12	15,0±0,26	15,0±0,33	13,2±0,24
	2	10,0±0,14	13,0±0,24	13,0±0,30	12,2±0,26

Примечание: *Длина корней и проростков гороха± в контроле составляла 7,3±0,12 мм и 6,0 ±0,14 мм ($p < 0,05$); 1-корни, 2-побеги.

Контрольные опыты по определению действия растворов различных белков на рост и развитие растений доказали действие лектинов гриба рода *Alternaria* на растительные объекты. Именно лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039 способствует увеличению длины корней и проростков у изучаемых культур.

Полученные данные по увеличению длины корней и побегов пшеницы и гороха после обработки семян лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 подтверждаются данными по определению их биомассы (таблицы 5.5, 5.6).

Определение биомассы корней пшеницы и гороха показало, что наибольшее количество биомассы образуется при обработке проросших семян лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10 мкг/мл и 20 мкг/мл, в данных вариантах опыта количество биомассы возрастало для пшеницы в 2,3-2,5 раз, для гороха 2,6-2,8 раз.

Таблица 5.5 – Биомасса корней и побегов пшеницы на 10 день выращивания растений после обработки лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (n = 3)

N	Концентрация лектина, мкг/мл	Биомасса корней, г/15 растений	Биомасса побегов, г/15 растений
1	контроль	0,70±0,02	0,30±0,02
2	5	1,21±0,02	0,60±0,04
3	10	1,72±0,04	1,22±0,02
4	20	1,63±0,04	0,98±0,04
5	40	1,62±0,04	0,87±0,04

Таблица 5.6 – Биомасса корней и побегов гороха на 10 день выращивания растений после обработки лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (n = 3)

N	Концентрация лектина, мкг/мл	Биомасса корней, г/ 15 растений	Биомасса побегов, г/15 растений
1	контроль	0,64±0,02	0,55±0,02
2	5	0,93±0,02	0,75±0,02
3	10	1,89±0,04	1,24±0,04
4	20	1,82±0,04	1,22±0,02
5	40	1,73±0,04	0,98±0,04

Данные концентрации (10 мкг/мл и 20 мкг/мл) лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 также вызвали увеличение биомассы побегов, в данных вариантах опыта количество биомассы возрастало для пшеницы в 3,3-4,0 раза, для гороха в 1,8-2,3 раза.

Общий прирост растительной биомассы у пшеницы был в 2,6-2,9 раз выше, чем в контроле, а для гороха, в 2,3-2,6 раз.

Таким образом, результаты исследований показали, что лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039 обладает ростостимулирующим действием на рост и развитие корней и проростков зерновых и бобовых культур, способствуя значительному приросту биомассы растений. Наиболее эффективная концентрация раствора лектина должна содержать 10 мкг/мл.

5.3 Влияние степени очистки лектинов *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 на ростостимулирующую активность растений

В работе исследовали препарат лектина различной степени очистки: лектин после разрушения мицелия гриба и центрифугирования (исходный препарат), препарат лектина, полученный осаждением белка сульфатом аммония и последующим диализом и препарат, полученный объединением фракций, проявляющих гемагглютинирующую активность, после разделения суммарного белка с помощью хроматографии (рисунок 5.3).

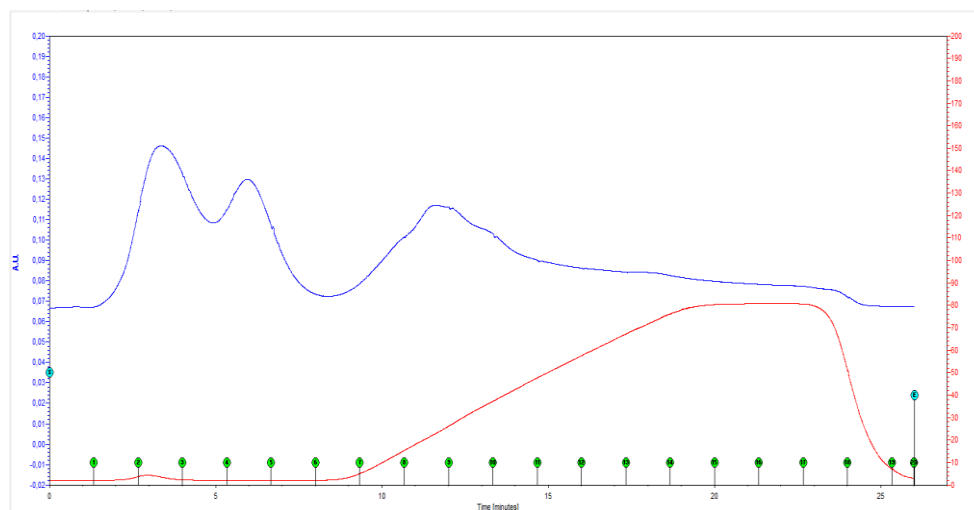


Рисунок 5.3 – Хроматограмма суммарной фракции белка микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 (на колонке Phenyl Sepharose High Performance)

На хроматограммах суммарной фракции белка видно наличие основных 3-х пиков. Титр активности лектинов был обнаружен во фракциях 2-5, что соответствует двум первым пикам. Расчеты показали, что белок лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 составляет 67-70 % от общей массы белка выделенного из мицелия гриба, что составляет $9,72 \pm 1,2$ г/л от общего белка, выделяемого из биомассы микромицета.

Фракции с гемагглютинирующей активностью объединяли и исследовали их биологическое действие на семена пшеницы и гороха в качестве одного из

вариантов, сравнительного исследования роста стимулирующего действия лектинов с различной степенью очистки (таблица 5.7 и 5.8).

Таблица 5.7 – Сравнительное влияние лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 различной степени очистки на рост и развитие пшеницы (n = 3)

Варианты опыта		Длина корней и побегов пшеницы, мм			
		концентрация лектина, мкг/мл			
		5	10	20	40
Исходный препарат лектина	1	12,0±0,12	24,3±0,20	22,5±0,12	19,7±0,14
	2	17,2±0,16	25,0±0,22	23,5±0,14	22,5±0,16
Препарат лектина после осаждения и диализа	1	12,2±0,14	24,5±0,33	22,6±0,14	19,9±0,23
	2	17,4±0,1	24,6±0,12	23,4±0,20	23,0±0,10
Препарат лектина после хроматографической очистки	1	26,7±0,14	24,5±0,12	21,6±0,14	20,6 ±0,14
	2	25,5±0,16	22,0±0,14	22,4±0,12	19,6±0,12

Примечание: *Длина корней и проростков пшеницы в контроле составляла 9,0±0,33 мм и 13,2±0,14 мм ($p < 0,05$); 1-корни, 2-побеги.

Таблица 5.8 – Сравнительное влияние лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 различной степени очистки на рост и развитие гороха (n = 3)

Варианты опыта		Длина корней и побегов гороха, мм			
		концентрация лектина, мкг/мл			
		5	10	20	40
Исходный препарат лектина	1	10,2±0,12	15,0±0,26	15,0±0,33	13,2±0,24
	2	10,0±0,14	13,0±0,24	13,0±0,30	12,2±0,26
Препарат лектина после осаждения и диализа	1	10,4±0,12	15,3±0,24	15,6±0,14	13,5±0,33
	2	10,8±0,33	13,4±0,12	13,2±0,26	12,4±0,20
Препарат лектина после хроматографической очистки	1	14,2±0,14	13,6±0,14	12,4±0,14	12,6 ±0,20
	2	17,2±0,20	16,4±0,24	15,4±0,12	14,6±0,22

Примечание: *Длина корней и проростков гороха в контроле составляла 7,3±0,12 мм и 6,0 ±0,14 мм ($p < 0,05$); 1-корни, 2-побеги.

Результаты исследований показали, что эффективность действия как исходного препарата, так и препарата после осаждения белка, и диализа, близки

по данным изменения длины корней и проростков у зерновых и бобовых культур. Это закономерно, поскольку концентрация белка в исходном препарате соответствует белку, осажденному сульфатом аммония. Концентрация лектина в растворах была равнозначна в обеих вариантах.

Обработка пророщенных семян растворами лектина, очищенного от сопутствующих белков, показала также положительное действие и на рост и развитие растений. Однако в данном варианте опытов наибольший эффект прироста корней и побегов наблюдался при более низких концентрациях лектина.

Для уточнения этого результата были проведены исследования по влиянию растворов лектина на пророщенные семена в растворах с концентрациями 1,25 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл (рисунок 5.4).

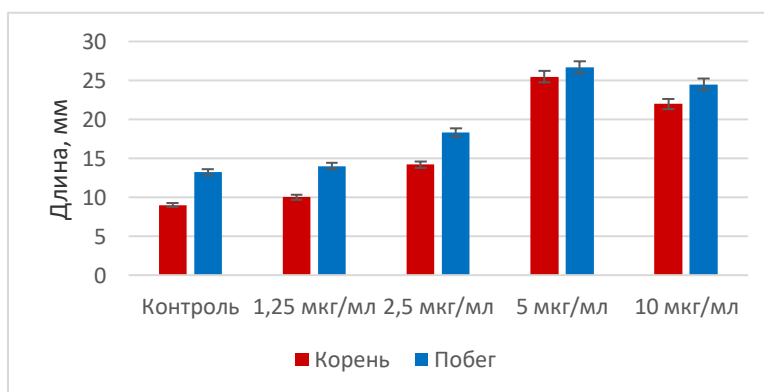


Рисунок 5.4 – Длина корней и побегов на 10 день выращивания пророщенных семян пшеницы, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039

Результаты опытов показали, что наибольший эффект прироста корней и побега в данном варианте опыта наблюдался при концентрации лектина 5 мкг/мл. Длина корней увеличивалась в 2,8 раза, а длина побегов - в 2,0 раза по сравнению с контролем. Увеличение концентрации лектина до 10 мкг/мл давало положительный эффект, но менее выраженный: длина корней увеличилась в 2,4 раза, длина побегов – в 1,7 раз, по сравнению с контролем. Снижение

концентрации лектина до значений 2,5 мкг/мл и 1,25 мкг/мл приводило к увеличению длины корней и проростков, но в меньшей степени (корни увеличивались в 1,1-1,6 раз, проростки – в 1,1-2,0 раз).

Такая же закономерность роста корней и проростков наблюдалась при действии лектина на пророщенные семена гороха (рисунок 5.5).

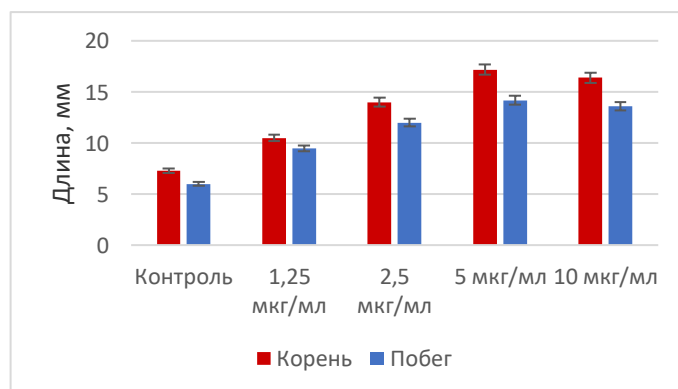


Рисунок 5.5 – Длина корней и проростков на 10 день выращивания пророщенных семян гороха, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039

При обработке семян гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 лучшие результаты по приросту длины корней и побегов были получены при использовании раствора лектина в концентрации 5 мкг/мл. В данном варианте опыта длина корней и проростков увеличивалась в 2,4 раза по сравнению с контролем. Обработка пророщенных семян лектином *A. alternata* 4 при концентрации 10 мкг/мл, также увеличивало длину корней гороха в 2,2 раза, побегов – в 2,3 раза. При обработке семян гороха лектином в концентрации 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл длина корней увеличивалась в 1,4-1,9 раз, проростков – в 1,6-2,0 раза.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все варианты препаратов лектинов разной степени очистки оказывают ростостимулирующее действие как на пшеницу, так и горох. Очистка препарата лектина от балластных

белков создает возможность снижения концентрации его раствора для обработки семян растений от 10 мкг/мл до значения 5,0 мкг/мл. При этом эффективность увеличения длины корней и проростков была незначительно выше (1,1-1,2 раза) по сравнению с обработкой семян раствором лектина с балластными белками в концентрации 10 мкг/мл. Поэтому для использования лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 в биотехнологии сельского хозяйства достаточно получение его в неочищенной форме.

5.4 Определение действия лектина микромицета *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 как средства защиты растений

При определении действия лектина как средства защиты растений в качестве прототипа исследований были взяты патенты, в которых для предпосевной обработки семян гороха использовали средство, содержащее салициловую кислоту, сульфат магния, лектины семян фасоли и воду [209], а в качестве средства для повышения системной индуцированной устойчивости гороха к грибным патогенам - препарат, содержащий кроме перечисленных выше соединений, экстракты Эхинацеи пурпурной, Синюхи голубой и сульфаты цинка [210].

Однако к недостаткам биологических препаратов, содержащим лектины растений, можно отнести трудоемкость их изготовления, сложность наличия стандартизированной сырьевой базы, а также длительность роста растительных объектов. Кроме того, большинство известных биопрепаратов имеют однонаправленное действие, например, только повышающие всхожесть растений. Однако, главенствующая роль остается за комплексными препаратами, обладающими несколькими функциями.

Поэтому следующей задачей наших исследований было определение способности лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 выполнять защитную функцию от поражения растений фитопатогенами.

Известно, что наиболее серьезные заболевания растений связаны, прежде всего, с такими заболеваниями растений, как фузариоз и альтернариоз, т.е. с развитием фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и рода *Alternaria*. При фузариозе наблюдается глубокое поражение растений. Происходит гниение корней, поражается сосудистая система растений, идет процесс увядания и гибели растений. Фузариоз характеризуется быстрым распространением, особенно в условиях высокой влажности и тепла. Альтернариоз характеризуется поражением тканей, листьев и плодов растений. При альтернариозе наблюдается появление четко очерченных пятен коричневого или черного цвета, часто с зональностью. Пораженные ткани усыхают, часто возникает «чернота зародыша» у зерновых. Это грибное заболевание поражает огромное количество различных видов растений и служит одной из основных причин неурожая. Особенно оно опасно в защищенном грунте, где альтернариоз развивается стремительно.

В экспериментах изучили способность лектинов к защите растений от фитопатогенов. Обработку корней 3-х суточных проростков посевного гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 проводили в концентрациях 5,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл в течение 24 ч. Контрольные образцы растений обрабатывались буферным раствором. На 5-ые сутки растения (опытные и контрольные) обрабатывались споровой суспензией фитопатогенных штаммов: в первом варианте - спорами фитопатогенного штамма *A. solani*, во втором – спорами фитопатогенного штамма *F. oxysporum*.

После обработки корней растений спорами фитопатогенов на 14 сутки анализировались данные по изменению длины подземной и надземной частей растений (рисунок 5.6). Для доказательства развития системной индуцированной устойчивости определяли изменение пероксидазной активности в процессе заражения растений фитопатогенами и снижение развития гнилостного процесса.

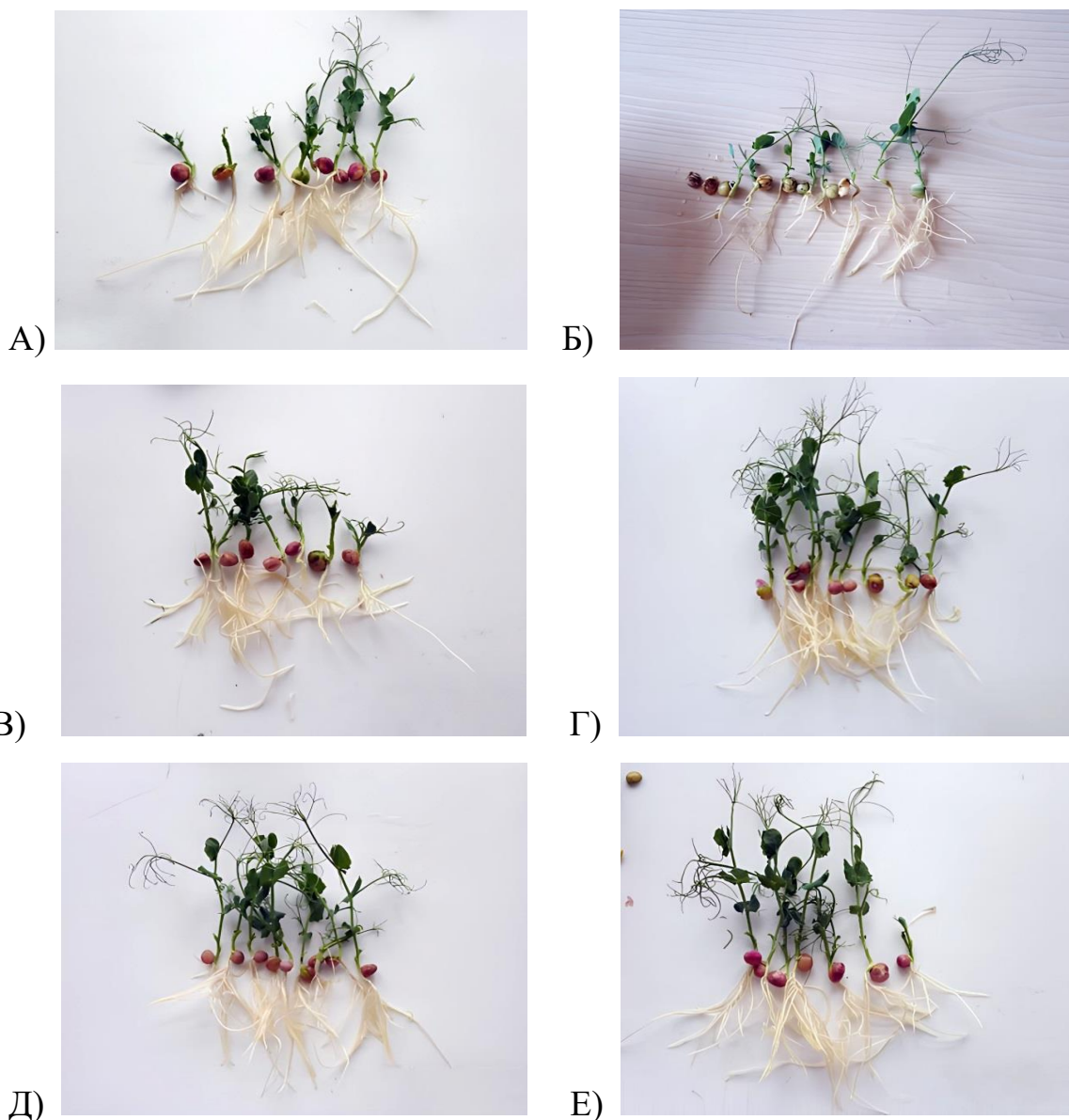


Рисунок 5.6 – Обработка проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 и спорами фитопатогенного гриба *A. solani*: А) контроль растения без обработки, Б) контроль – проростки гороха, обработанного *A. solani*, В) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 5 мкг/мл и спорами *A. solani*, Г) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10 мкг/мл и спорами *A. solani*, Д) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 20 мкг/мл и спорами *A. solani*, Е) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 40 мкг/мл и спорами *A. solani*

Результаты исследований показали, что растения, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039, были более устойчивыми к заражению фитопатогенами.

A. solani - это фитопатоген, активно поражающий надземную часть растений. Его действие хорошо видно на рисунке 5.6, где процесс роста и развития растения заторможен. При поражении фитопатогеном *A. solani* наблюдалось замедление всхожести семян, медленное развитие корневой системы и проростков. Особенно наглядно видно поражение листовой системы растений. Количество листьев было значительно меньше, чем в контроле. Данная картина значительно отличалась от опытных образцов, когда проводилась обработка 3-х суточных проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в различных концентрациях. В этих вариантах наблюдалась активизация процессов развития растений, несмотря на инфицирование растений фитопатогеном. Обработка растения лектином, даже после инфицирования, позволяла растению активно развиваться, наращивать длину надземной и подземной частей. Происходит активное развитие листовой системы. Растение имело вид не поврежденного растения. Данное положительное действие лектина на растения наблюдалось при всех исследуемых концентрациях лектина. Однако наиболее эффективные изменения отмечались при обработке растений лектином в концентрации 10 мкг/мл.

Морфометрический анализ развития растений показал, что при обработке проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 5 мкг/мл, длина подземной части растений увеличивалась в 1,4 раза, длина надземной части – в 2,0 раза по сравнению с контролем, обработанным спорами гриба *A. solani*. При обработке семян гороха лектином в концентрации 10 мкг/мл длина подземной части растений увеличивалась в 2,2 раза, длина надземной части – в 2,6 раз. При обработке проростков гороха лектином в концентрации 20 мкг/мл длина подземной части растений увеличивалась в 2,2 раза, длина надземной части

– в 2,4 раза. Увеличение концентрации лектина в растворе для обработки проростков гороха до 40 мкг/мл не вызывало дальнейшего увеличения роста подземной и надземной частей изучаемых растений (рисунок 5.7).

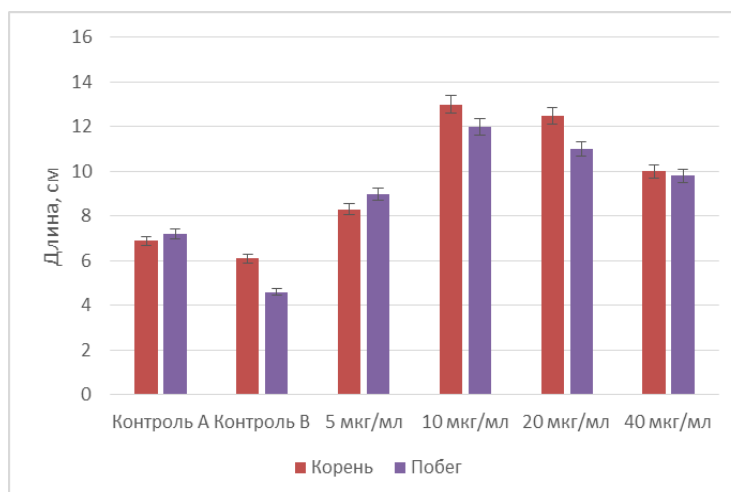


Рисунок 5.7 – Влияние лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на длину корней и побегов посевного гороха, обработанного спорами фитопатогена *A. solani*: а) контроль (без обработки растений лектином и спорами фитопатогена); б) контроль с обработкой растений спорами фитопатогена; далее - растения, обработанные лектином в различных концентрациях и спорами фитопатогена

Таким образом, обработка проросших семян гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 способствует защите растений от инфицирования *A. solani*, а также сохраняет свою способность стимулирующего действия на развитие подземной и надземной части растений. Наибольший эффект действия препарата был отмечен при обработке растений лектином в концентрации 10 мкг/мл.

Для выявления защитной функции лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 против других фитопатогенов была проведена следующая серия опытов, когда на 5 сутки инфицировали растение гороха спорами фитопатогенного штамма *F. oxysporum* (рисунок 5.8).

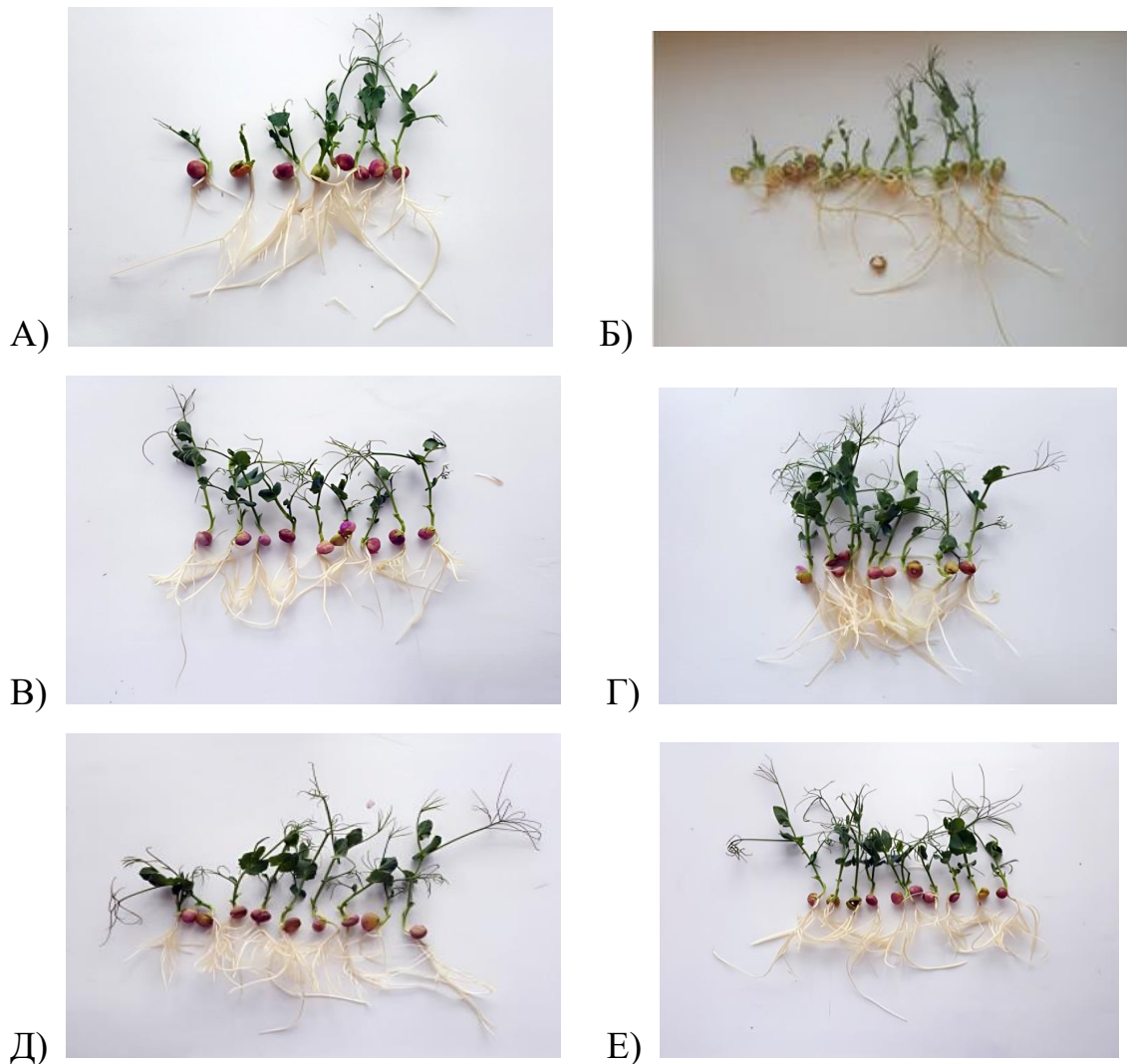


Рисунок 5.8 – Обработка проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 и спорами фитопатогенного гриба: А) контроль – растения без обработки, Б) контроль – проростки гороха, обработанного *F. oxysporum*, В) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 5 мкг/мл и спорами *F. oxysporum*, Г) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10 мкг/мл и спорами *F. oxysporum*, Д) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 20 мкг/мл и спорами *F. oxysporum*, Е) опыт – проростки гороха, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 40 мкг/мл и спорами *F. oxysporum*

F. oxysporum - гриб, фитопатоген, поражающий больше корневую часть растений. Его действие хорошо видно на рисунке 5.8 Б, при действии на не обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 проростки. В данном случае наблюдается значительное замедление развития корней и проростков, а в дальнейшем и общее угнетение роста растений. Особенно четко выражено почернение корней, что характерно для фузариоза, когда поражена сосудистая система растений. Однако, если провести предварительную обработку проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039, то нормальный рост растений наблюдается даже после инфицирования *F. oxysporum*. На рисунке 5.7 видно, что все концентрации лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 проявляют защитное действие в отношении фитопатогена *F. oxysporum*. Обработка растений лектином, несмотря на инфицирование растений этим патогеном, способствует активации процессов роста подземной и надземной частей растений. Корни удлиняются. Рост растений активен, происходит активное формирование листьев, почернений корней не обнаруживается. Подтверждение данных результатов отражено в диаграмме (рисунок 5.9).

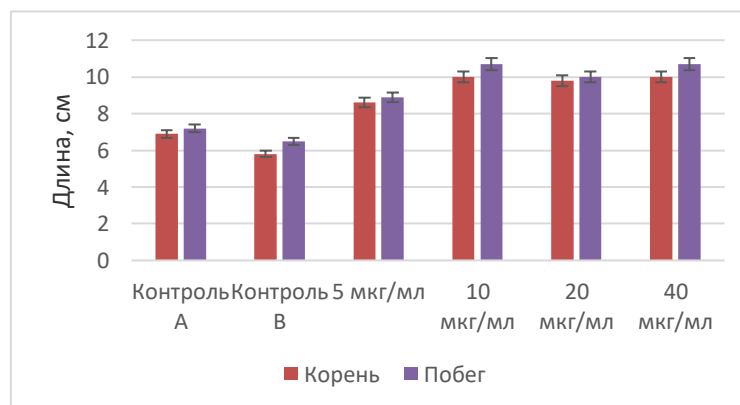


Рисунок 5.9 – Влияние лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 на длину корней и побегов посевного гороха, обработанного спорами фитопатогена *F. oxysporum*:

- А) контроль (без обработки растений лектином и спорами фитопатогена),
- В) контроль с обработкой растений спорами фитопатогена, далее растения, обработанные лектином разной концентрации и спорами фитопатогена

Результаты исследований показали, что при обработке проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 5 мкг/мл и спорами *F. oxysporum*, длина подземной части растений увеличивалась в 1,5 раз, длина надземной части – в 1,6 раз по сравнению с контролем, обработанным спорами гриба *F. oxysporum*. При обработке проростков гороха лектином в концентрации 10 мкг/мл длина подземной части растений увеличивалась в 1,7 раз, длина надземной части – в 1,9 раз. При обработке проростков гороха лектином в концентрации 20 мкг/мл длина подземной части растений увеличивалась в 1,7 раз, длина надземной части – в 1,8 раз. Увеличение концентрации лектина до 40 мкг/мл не вызывало дальнейшего роста подземной и надземной части растений.

Полученные результаты показали, что обработка проростков растений лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039, не только защищает растение от фузариоза, но и способствует стимуляции роста растений. Лучшие результаты наблюдались при обработке растений лектином в концентрации 10 мкг/мл.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039 обладает выраженной защитной функцией относительно различных видов фитопатогенных организмов.

Сравнение показателей увеличения роста подземной и надземной части растений, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 и спорами, как *A. solani*, так и спорами *F. oxysporum*, показало, что лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039, способен к защите растений, и от альтернариоза, и от фузариоза. Однако, лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039 лучше защищал растений от *A. solani*, чем от *F. oxysporum*, поскольку длина подземной и надземной частей растений при обработке спорами *A. solani* в данном варианте опытов были выше, чем при обработке спорами *F. oxysporum*. Можно предположить, что одним из механизмов защитного действия лектинов на растения является их способность к адгезии на поверхностных рецепторах растительной клетки, которые после взаимодействия с лектинами не позволяют фитопатогену проникать внутрь клетки. Чем выше

средство лектинов с фитопатогеном, тем выше защитное действие.

С другой стороны, можно было предположить, что лектины микроорганизмов могут выступать и в качестве факторов индуцированной устойчивости организма, как это отмечалось для лектинов фасоли [210]. Одним из основных методов оценки способности биопрепаратов к развитию индуцированной устойчивости у растений, является измерения пероксидазной активности.

Пероксидазная активность была нами изучена в 4-х вариантах: 1 – контроль (исходные растения), 2 – растения, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10,0 мкг/мл, 3 – контроль, с инфицированием растений спорами фитопатогенного штамма *F. oxysporum*, 4 – растения, обработанные известным препаратом «Циркон» (концентрация 10 мкг/мл) и инфицированные спорами штамма *F. oxysporum*, 5 – растения, обработанные лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (концентрация 10,0 мкг/мл) и инфицированные спорами штамма *F. oxysporum* (таблица 5.9).

Таблица 5.9 – Динамика изменения пероксидазной активности в корнях гороха неинфицированных и инфицированных проростков в условных единицах (n = 5)

Дни	1. Контроль	2. Лектин <i>A. alternata</i> ВКПМ F-2039 (концентрация 10 мкг/мл)	3. Контроль (инфицирован)	4. Препарат «Циркон» (концентрация 10 мкг/мл), (инфицирован)	5. Лектин <i>A. alternata</i> ВКПМ F-2039 (концентрация 10 мкг/мл), (инфицирован)
4	90,2±2,2	160,4±2,2	274,2±1,9	396,3±3,2	436,4±1,6
5	110,0±1,2	162,2±2,0	394,2±2,6	405,6±2,6	550,2±2,2
6	129,2±1,7	150,8±2,2	392,4±2,2	412,6±2,2	552,4±2,4
7	130,4±3,2	140,6±1,8	342,2±2,6	395,4±2,4	490,0±3,2

Полученные результаты показали, что сам лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039 в концентрации 10 мкг/мл, повышает пероксидазную активность в корнях гороха в 1,2-1,8 раз. Увеличение значений данного показателя говорит о повышении

устойчивости растения, его иммунного статуса, при использовании лектина. Инфицирование проростков фитопатогеном, в том числе *F. oxysporum*, усиливало иммунный ответ растений, активность пероксидазы резко возрастает, начиная с первых суток инфицирования растений, а затем плавно снижается. Аналогичное изменение активности пероксидазы наблюдалось в работах Павловской с сотрудниками [190]. Предварительная обработка проростков гороха лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 усиливает защитные реакции пораженных растений в 3,5 раза по сравнению с инфицированным контролем. Активность пероксидазы возрастает, поскольку активность этого фермента коррелирует с запрограммируемой устойчивостью организма. Для сравнения эффективности действия лектина *A. alternata* ВКПМ F-2039 в эксперименте использовали коммерческий препарат «Циркон» в концентрации соответствующей концентрации изучаемого лектина. В данном варианте опытов активность пероксидазы повышалась в 2,5 раз. Таким образом, активность пероксидазы в корнях гороха была значительно выше, когда обработка растений проводилась лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039 (таблица 5.9).

Устойчивость растений на грибную инфекцию можно установить по определению развития некрозов, характеризующихся появлением черно-бурых пятен. В вариантах проростков, обработанных лектином *A. alternata* ВКПМ F-2039, развитие некрозов не наблюдалось. В отличие от контрольного варианта, обработанного *F. oxysporum*, когда через сутки после инфицирования растений на их корнях наблюдалось потемнение.

Таким образом, лектин *A. alternata* ВКПМ F-2039, как отмечалось выше, обладает не только ростостимулирующим свойством, но и защитной функцией, включая не только поверхностное взаимодействие с рецепторами растительных клеток, но и способностью к повышению системной устойчивости растений, о чем свидетельствуют данные по увеличению пероксидазной активности.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ *ALTERNARIA ALTERNATA* ВКПМ F-2039 ГЛУБИННЫМ СПОСОБОМ

Продуктом разработанной биотехнологии является лектин мицелиального гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 и созданный на его основе препарат – Барьер в жидкой форме. Основным действующим началом препарата Барьер является лектин, составляющий 67-70 % от общего белка. Сопутствующие компоненты (углеводы, балластные белки) не препятствуют проявлению целевой биологической активности, что позволяет рассматривать его как готовый препарат для растениеводства.

При разработке технологии жидкофазного культивирования гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 за основу были взяты рекомендации отраслевых руководств по проектированию процессов ферментации и специализированные публикации по глубинному культивированию микромицетов [211–213]. Кроме того, при выборе параметров и аппаратного оформления ориентировались на действующие «Нормы технологического проектирования дрожжевого производства», поскольку именно этот тип производства наиболее распространен в России. Важной частью требований к будущему производству является обеспечение проведения всех стадий процесса в помещениях, отвечающих санитарно-гигиеническим и климатическим нормам для чистых зон, что регламентируется соответствующими нормативными документами [214].

Разработанная блок-схема технологии глубинного жидкофазного культивирования *A. alternata* ВКПМ F-2039 включает ряд функциональных модулей, последовательно реализующих основные этапы процесса (рисунок 6.1). При её формировании учитывали специфику отдельных операций и необходимость их пространственного разделения: зонирование производства выполнено с учётом требований к чистоте, санитарному режиму и контролю

параметров среды на каждой стадии [215].

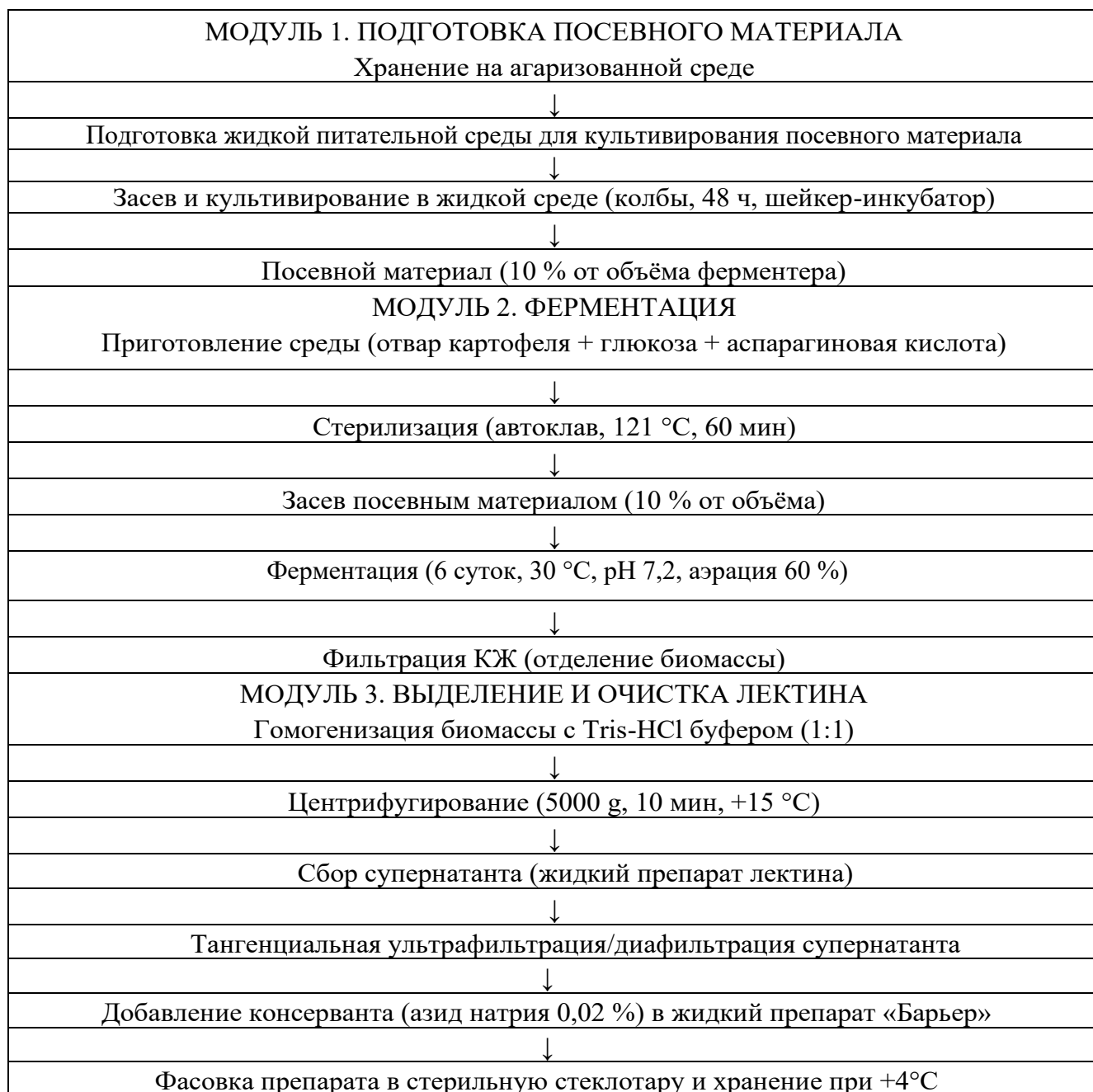


Рисунок 6.1 – Блок-схема биотехнологии жидкофазного культивирования

A. alternata ВКПМ F-2039

В отличие от классических схем выделения лектинов, включающих высаливание сульфатом аммония, диализ, гель-фильтрационную и ионообменную

хроматографию, предлагаемая мембранная технология позволяет получить неочищенный препарат с сохранением высокой активности, но при значительно меньших затратах. Этот факт согласуется с экспериментальной частью работы, где проведено сравнение биологической активности лектина различной степени очистки. Установлено, что все варианты препарата проявляют ростстимулирующее действие на пшеницу и горох, при этом достоверные различия в эффективности между исходным препаратом и препаратом после осаждения с диализом отсутствуют. В связи с этим в разработанной биотехнологии стадия глубокой очистки не предусмотрена. Стадия ультрафильтрации с диафильтрацией введена для концентрирования целевого продукта и удаления низкомолекулярных примесей (солей, метаболитов), что не изменяет белково-углеводный состав препарата и не влияет на его биологическую активность, что подтверждено сохранением титра гемагглютинации (2048 ед.) после обработки.

От лиофилизации препарата в данном случае можно отказаться в связи с отсутствием производственной необходимости. Жидкая форма препарата с консервантом (рассматривается азид натрия 0,02 %) в стерильных условиях при температуре 4 °С сохраняет активность не менее 6 месяцев, что достаточно для сезонных обработок.

6.1 Материальный баланс получения высокоактивных лектинов *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

На основании составленной технологической блок-схемы разработанной биотехнологии жидкофазного культивирования *A. alternata* ВКПМ F-2039, полученных экспериментальных результатов и данных литературы [216], рассчитан материальный баланс получения продуктов культивирования микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039. За исходные данные были приняты

объемы производства продуктов в год, необходимые для их сертификации и дальнейшего обеспечения ежегодного выпуска продукции, востребованной на рынке.

Исходные данные: картофель 20 кг на 100 л; вода питьевая 100 л; глюкоза 2 кг на 100 л; аспарагиновая кислота 0,005 кг на 100 л.

На основе картофельного отвара (таблица 6.1) готовят картофельно-глюкозную среду, используемую в качестве питательной среды в ферментёре. Состав среды и расход компонентов на один производственный цикл представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.1 – Приготовление отвара картофеля

Приход	кг	%	Расход	кг	%
Картофель	20.0	16.7	Отвар картофеля	95.0	79.2
Вода питьевая	100.0	83.3	Варёный картофель	20.0	16.7
			Потери (испарение)	5.0	4.1
Итого:	120.0	100.0	Итого:	120.0	100.0

Таблица 6.2 – Приготовление картофельно-глюкозной среды

Приход	кг	%	Расход	кг	%
Отвар картофеля	95.0	93.1	КГ среда	100.0	98.0
Глюкоза	2.0	2.0	Потери (стерилизация)	2.0	2.0
Аспарагиновая кислота	0,005	0,005			
Вода (долив)	5.0	4.9			
Итого:	102.005	100.0	Итого:	102.0	100.0

Согласно расчетам для осуществления жидкофазного культивирования необходимо подготовить 100 л ГК среды с добавкой (аспарагиновая кислота).

Параметры цикла:

Вход:

КГ среда: 100 л.

Выход:

Биомасса: 3.62 кг (36.2 г/л).

Культуральная жидкость: 95.38 л (с учётом испарения).

Лектин (неочищенный): 1.45 кг (из биомассы).

Для перехода к расчётам материального баланса стадии выделения была составлена сводная таблица первого модуля (таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Сводная таблица параметров цикла

Приход	кг/л	%	Расход	кг/л	%
КГ среда	100,0	90,9	Биомасса	3.62	3.3
Посевной материал	10	9.1	Культуральная жидкость	95.38	86.7
			Потери (СО ₂ , испарение)	11	10
Итого:	110.0	100.0	Итого:	110	100.0

Примечание: Процесс подготовки инокулята указан в пункте 6.1 при описании Модуля 1. Для ферментации нужно 10 л посевного материала. Сумарная стоимость посевного материала объемом 10 л с учетом затраты на сырье, воду и электричество составляет 100 рублей. Таким образом, расходы на производство инокулята на 1 цикл от общей себестоимости составляют чуть больше 0,03%. Из-за низкого расхода на производство инокулята было принято решение не учитывать этот раздел в материальном балансе. Включение этих затрат не изменит итоговые показатели себестоимости и рентабельности, так как их вклад менее 0,1%.

На основании рассчитанного материального баланса 1 модуля были детализированы показатели для стадий выделения и концентрирования лектина. Материальный баланс основных потоков на данных стадиях приведён в таблицах 6.4 и 6.5.

Таблица 6.4 – Стадия выделения лектина

Приход	кг	%	Расход	кг	%
Биомасса	3.62	50.0	Супернатант (лектин)	4,59	63,4
Буфер (20 мМ Tris-HCl)	3,62	50,0	Осадок (утилизация)	2,65	36,6
Итого:	7.24	100.0	Итого:	7.24	100.0

Примечание: масса супернатанта определена как сумма массы буфера (3,62 кг) и растворимых компонентов биомассы

Таблица 6.5 – Стадия концентрирования лектина

Приход	кг	%	Расход	кг	%
Экстракт (супернатант)	4,59	100,0	Концентрат лектина (жидкий)	1,45	31,6
			Пермеат (вода, возврат)	3,14	68,4
Итого	4,59	100,0	Итого	4,59	100,0

Результаты расчета сводного материального баланса разрабатываемой биотехнологии жидкофазного культивирования аскомицета *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 приведены в таблице 6.6.

Всего предусмотрено в год 30 циклов культивирования аскомицета *A. alternata* ВКПМ F-2039, по расчетам производительность 1 цикла составляет – 3,62 кг биомассы, соответственно 1,45 кг выделенного из нее лектина, активного компонента препарата Барьер.

Таблица 6.6 – Сводный материальный баланс на 1 цикл (100 л) культуральной жидкости *A. alternata* ВКПМ F-2039

Приход	кг	%	Расход	кг	%
Картофель	20,0	14,2	Концентрат лектина	1,45	1,0
Вода питьевая (всего)	105,0	74,7	Культуральная жидкость (отход)	95,38	67,8
Глюкоза	2,0	1,4	Осадок (утилизация)	2,65	1,9
Аспарагиновая кислота	0,005	0,004	Пермеат (вода, возврат)	3,14	2,2
Посевной материал	10,0	7,1	Потери (испарение, CO ₂ , стерил.)	11,0	7,8
Буфер (Tris-HCl)	3,62	2,6	Варёный картофель (отход)	20,0	14,2
			Прочие потери	7,0	5,0
Итого	140,6	100,0	Итого	140,6	100,0

Как видно из таблицы 6.6, основная масса сырьевых потоков приходится на стадию приготовления питательной среды и культивирования продуцента, что определяет требования к объёму ферментационного оборудования.

6.2 Разработка аппаратурно-технологической схемы биотехнологии получения высокоактивных лектинов *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

На основании рассчитанного материального баланса подобрано технологическое оборудование для основных и вспомогательных технологических операций, разработанной биотехнологии жидкофазного культивирования аскомицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 (таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Технологическое оборудование

Наименование оборудования	Марка	Цена в рублях	Кол-во, шт.
Основное оборудование			
Ферментер	Bailun	9 000 000	1
Варочный котел	ВКЭ-500	400 000	1
Машина для мытья овощей	МТМ-600К	75 000	1
Центрифуга	Avanti J-26XP	7 000 000	1
Ультрафильтрационная установка	-	800 000	1
Вспомогательное оборудование			
Воздушный компрессор	ET- Compressors	1 400 000	1
Парогенератор	Ural-Power	1 000 000	1
Чиллер	Planer	2 000 000	1
Размольная гарнитура	ESSA	800 000	1
Весы	MERTECH	175 000	1

Примечание: цены указаны на 2 половину 2025 г.

Из данных таблицы 6.7 следует, что ключевым аппаратом процесса является ферментер, в котором осуществляется основная стадия глубинного культивирования продуцента. Остальные единицы оборудования обеспечивают подготовку среды, выделение мицелия, экстракцию лектина, его концентрирование и фасовку готового препарата.

Обобщённое аппаратурное оформление предложенного процесса представлено на принципиальной технологической схеме производства лектина на основе штамма гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 (рисунок 6.2).

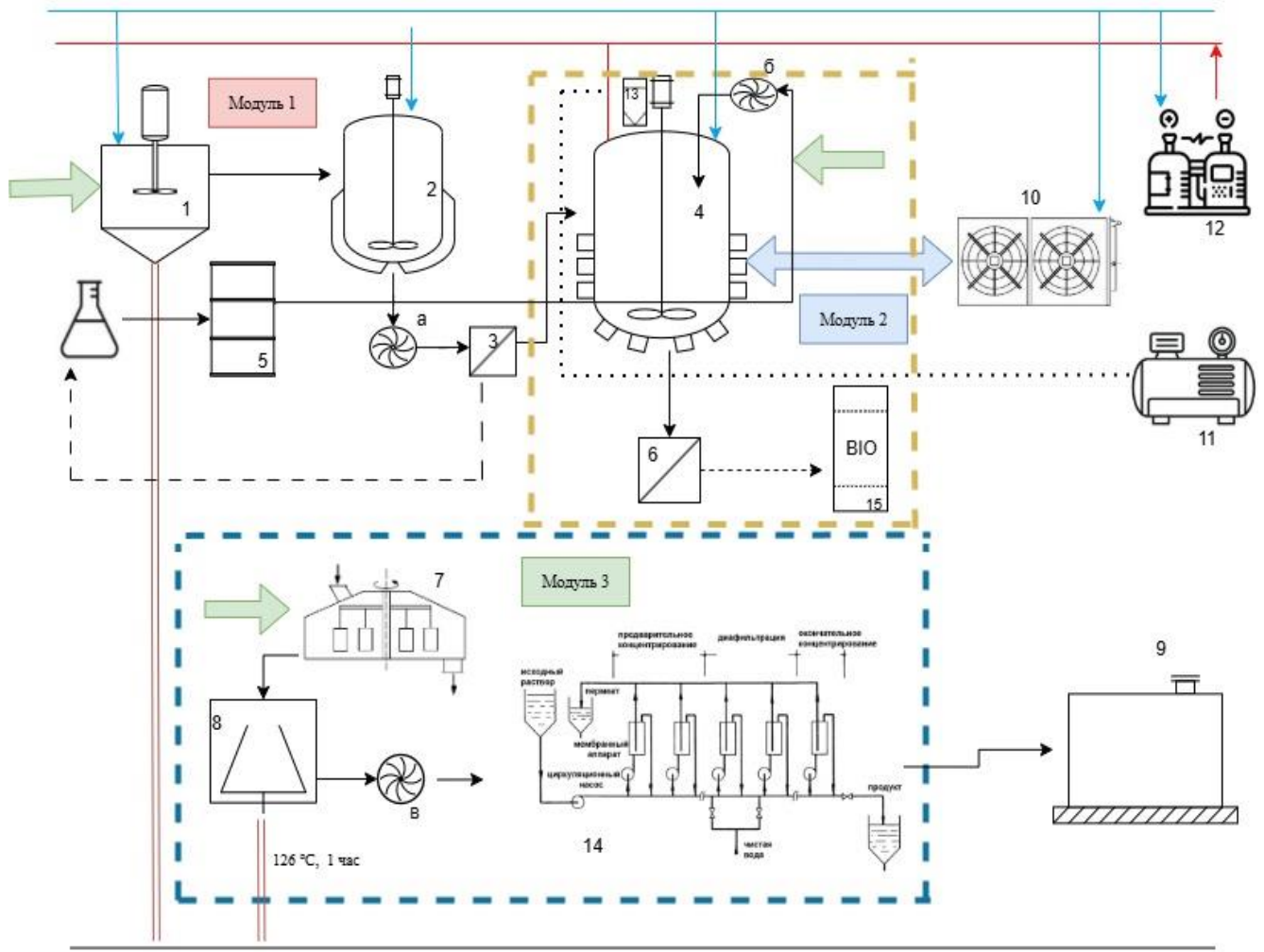


Рисунок 6.2 – Принципиальная технологическая схема производства лектина на основе штамма гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039: 1 – машина для мытья овощей; 2 – варочный котел; 3 – фильтр; 4 – ферментер; 5 – шейкер-инкубатор; 6 – фильтр; 7 – размольная гарнитура; 8 – центрифуга; 9 – промышленный холодильник; 10 – чиллер; 11 – компрессор; 12 – парогенератор; 13 – фильтр очистки входящего воздуха; 14 – ТУФ с диафильтрацией; 15 – резервуар; (а, б, в) – насосы

Таким образом, представленная аппаратурно-технологическая схема объединяет результаты расчёта материального баланса, выбор оборудования и последовательность основных стадий получения препарата Барьер, обеспечивая целостное представление о разработанной биотехнологии.

Поэтапное описание технологического процесса:

Модуль 1. Посевной материал получают в две стадии: сначала на агаризованной картофельно-глюкозной среде (ГКА) при 28 °С в течение 5-7 суток, затем в жидкой картофельно-глюкозной среде в колбах на шейкер-инкубаторе (48 ч, 28 °С, 200 об/мин). Полученную культуру используют для засева ферментера в количестве 10 % от объёма питательной среды. Все операции проводят в асептических условиях.

Подготовка питательной среды происходит в несколько этапов. Картофель моют, варят, затем отделяют отвар от вареного картофеля. К отвару картофеля добавляют глюкозу и стимулирующие добавки. Стерилизацию питательной среды проводят насыщенным паром при 121 °С в течение 60 мин, затем охлаждают до 30 °С. Для охлаждения используют оборотную воду через рубашку ферментера.

Модуль 2. Посевной материал через стерильные силиконовые шланги насосом (б) поступает в ферментер 4. После чего начинается культивирование гриба при следующих показателях 30 °С; рН = 7,2±0,1; обогащение кислородом 60 %. Далее по истечении 6 суток, когда культура выходит на стационарную фазу, полученную КЖ фильтруют через промышленную ткань для биопроцессинга фирмы «АкваАналитикс Техника» для получения биомассы.

Культуральную жидкость после отделения биомассы собирают в отдельную емкость, инактивируют при 90 °С 30 мин и используют для приготовления буферных растворов на последующих циклах. При необходимости, возможно её применение для рециклинга воды после соответствующей обработки.

Модуль 3. Выделенный мицелий подвергают гомогенизации путем растирания на размольной гарнитуре в течение 1 ч. После чего размолотый

материал смывают небольшим количеством буфера в центрифужные чашки и осаждают центрифугированием при температуре 15 °С. Далее супернатант сливают с центрифужной чашки и берут в последующую работу, а центрифужные чашки с отработанным осадком подвергают стерилизации в автоклаве при температуре 126 °С, 1 ч.

Выделенный мицелий гомогенизируют на размольной гарнитуре (ESSA B800) в течение 1 ч с добавлением 20 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,2) в соотношении 1 : 1 (масса : объём). Далее гомогенат центрифугируют в режиме 5000 g, в течение 10 мин, при температуре 15 °С для удаления клеточного дебриса. Супернатант, который представляет собой экстракт лектина, направляют на ультрафильтрацию.

Тангенциальная ультрафильтрация с диафильтрацией. Использовалась мембрана с отсекаемой молекулярной массой 10 кДа (MWCO). Процесс проводят при температуре 20-25 °С и давлении 1-3 атм. Экстракт концентрируют в 5-10 раз, затем проводят диафильтрацию против 20 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,2) для удаления низкомолекулярных примесей (солей, остатков сахаров, метаболитов). Полученный концентрат содержит белок, извлечённый из биомассы ($\approx 0,97$ кг на цикл), из которого 67-70 % приходится на лектин.

В концентрат добавляют консервант, 0,02 % азид натрия, для предотвращения микробной контаминации при хранении. Препарат разливают в стерильную стеклотару и хранят при плюс 4 °С. Срок хранения – не менее 6 мес без потери активности, т.е. сохранением титра гемагглютинации 2048 ед.

Предложенная технология позволяет получать отечественный жидкий препарат лектина, пригодный для применения в агропромышленном секторе. Отказ от хроматографической очистки и лиофилизации обусловлен экспериментально доказанной достаточностью неочищенной формы (глава 5) и экономической целесообразностью.

ГЛАВА 7. ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗРАБОТАННОГО ПРЕПАРАТА БАРЬЕР

7.1 Оценка токсичности препарата Барьер на примере микроорганизмов

Получение эффективного препарата для растениеводства требует его исследования на токсичность. Классическим вариантом исследования веществ на токсичность является их действие на дефектные штаммы бактерий. В наших вариантах опыта, в качестве тест-объекта, использовали бактерии *S. typhimurium* TA100.

При проверке на токсичность исследуемое соединение считается не токсичным, если выживаемость тест-штаммов бактерий при контакте с ним составляет $\geq 50\%$.

Препарат Барьер проверялся в концентрациях (10-400 мкг/мл) для получения статистически достоверных данных (таблица 7.1). Для оценки токсичности растворов использовали критерий «выживаемость» клеток.

Таблица 7.1 – Токсический потенциал препарата Барьер в отношении штамма *S. typhimurium* TA 100 (n = 5)

Исследуемые растворы	Концентрация лектина, мкг/мл	Число КОЕ/чашка	Выживаемость, %
Негативный контроль	0	121,5 ± 7,5	
Барьер	400	119,6 ± 6,5	98,4*
-	40	122,0 ± 8,6	100,4*
-	20	127,4 ± 7,8	104,9*
-	10	130,7* ± 9,4	106,9*

Примечание: * – Статистически достоверно отличается от негативного контроля, $P \leq 0.05$; Негативный контроль, вместо исследуемого вещества внесен PBS буфер.

В результате исследований было выявлено, что препарат Барьер во всех исследованных концентрациях не проявлял токсичность по отношению к тест-штамму *S. typhimurium* TA100.

Данный тест проводился не только с целью определения наличия токсического действия изучаемых препаратов, но и для подбора их оптимальных,

нетоксичных концентраций, для дальнейшего исследования препаратов в тесте по оценке мутагенной активности (тест Эймса).

7.2 Оценка мутагенного потенциала препарата Барьер в тесте Эймса

Мутагенность вещества оценивают путём сравнения числа колоний-ревертантов в исследуемом образце и негативном контроле. Вещество считают мутагенным, если количество колоний-ревертантов под его действием превышает показатель негативного контроля более чем в 2 раза [192].

Проверку на мутагенность препарата Барьер проводили на двух тестерных штаммах *S. typhimurium* TA98 и *S. typhimurium* TA100, которые являются ауксотрофами по гистидину за счет точечной мутации в разных участках гистидинового оперона.

Поскольку значения числа КОЕ/чаш. при определении токсичности препарата Барьер незначительно отличались от такового в контрольном варианте при всех изучаемых концентрациях, это позволило нам использовать данные растворы в соответствующих разведениях в тесте Эймса (таблица 7.2).

Таблица 7.2 – Мутагенный эффект растворов препарата Барьер в тесте Эймса (n = 5)

Исследуемые образцы	Концентрация лектина, мкг/мл	Число колоний His ⁺ ревертантов/чашка	
		TA98	TA100
Негативный контроль	0	20,3±1,5	75,7±5,4
Позитивный контроль	0	625±29,31*	935±42,14*
Барьер	400	30,2±2,1	90,8±5,6
-	40	33,2±2,1	96,8±5,6
-	20	37,5±1,2	103,2±6,1
-	10	36,8±1,8	102,7±4,8

Примечание: * – статистически достоверно отличаются от позитивного контроля, $p \leq 0.05$; Негативный контроль – число колоний при внесении в реакционную смесь 0,1 мл Tris-HCl буфера. Позитивный контроль – азид натрия (2 мкг/чашка) для штамма TA100 и 2-нитрофлуорен (10 мкг/чашка) – для штамма TA98.

Результаты исследований показали, что ни одна из исследованных концентраций препарата Барьер в тесте Эймса не вызывала превышение числа колоний, индуцированных His⁺-ревертантов над спонтанным фоном мутирования (негативный контроль) более, чем в 2-2,5 раза, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности исследованных растворов.

Расчет индекса мутирования препарата Барьер показал низкие значения (ИМ 1,2-1,8), что можно расценивать как отсутствие его мутагенной активности [193].

Таким образом, проверка препарата Барьер на токсичность и мутагенность показала его безопасность.

7.3 Физико-химические свойства препарата Барьер

Важными показателями использования белковых препаратов в биотехнологии и сельском хозяйстве являются их устойчивость к температуре и рН значениям.

В наших экспериментах мы определяли несколько таких показателей: оптимальные значения температуры и рН, при которых наблюдается максимальный титр активности лектинов, а также их термо- и рН- стабильность при изменении данных значений в реакционной среде.

7.4 Определение температурного диапазона действия препарата Барьер и его термостабильность

Титр активности лектина препарата Барьер наблюдался в широком диапазоне температур 5-70 °С (рисунок 7.1). Максимальная активность лектина определялась в области от 5 °С до 50 °С. В данном диапазоне показатели титра активности лектинов находились на самом высоком уровне. Снижение титра активности лектинов в 2 раза наблюдалось при температуре 60 °С, а при

температуре 75 °С и длительности инкубации лектина при данной температуре в течение 20 мин активность лектина препарата Барьер не проявлялась, что, по-видимому, связано с нарушением его структуры.

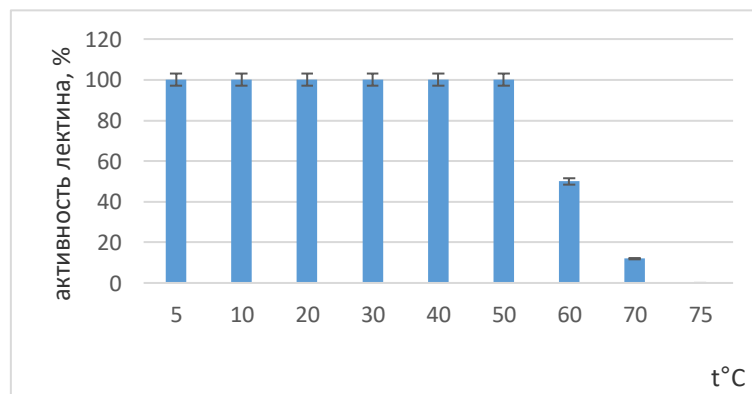


Рисунок 7.1 – Температурный диапазон активности лектина препарата Барьер

Изучение температурной стабильности препарата Барьер показало его стабильность в диапазоне 5-70 °С (таблица 7.3). Данный диапазон стабильности зависел от времени действия температуры: при 5-50 °С активность лектина сохранялась полностью в течение 60 мин, при 60 °С активность лектина снижалась на 50 % через 30 мин инкубации. Дальнейшее повышение температуры до 65 °С и 70 °С приводило к резкому снижению активности лектина через 15 мин и 10 мин соответственно. При 75 °С лектин полностью терял свою биологическую активность.

Таблица 7.3 – Влияние температуры на активность лектина препарата Барьер

Барьер	Т – оптимум (Т 50 %)	Время полунинактивации, мин					
		5-50 °С	55 °С	60 °С	65 °С	70 °С	75 °С
	5-50 (5-70)	ст	50	30	15	10	нс

Примечание: * Т50 % - диапазон температур, при которых титр активности лектина на 50 % выше от наибольшего значения; ст – белок стабилен при инкубации в течение 60 мин; нс – белок не стабилен и инактивируется за 5 мин.

7.5 Определение pH-диапазона действия препарата Барьер и его стабильность при различных значениях pH среды

Наиболее высокий титр активности лектина препарата Барьер располагался в диапазоне pH 6,5-8,5 (рисунок 7.2). Активность лектина снижалась на 50 % при значениях pH 6,0 и 9,0, а при pH 5,0 и 10,0 на 90 %.

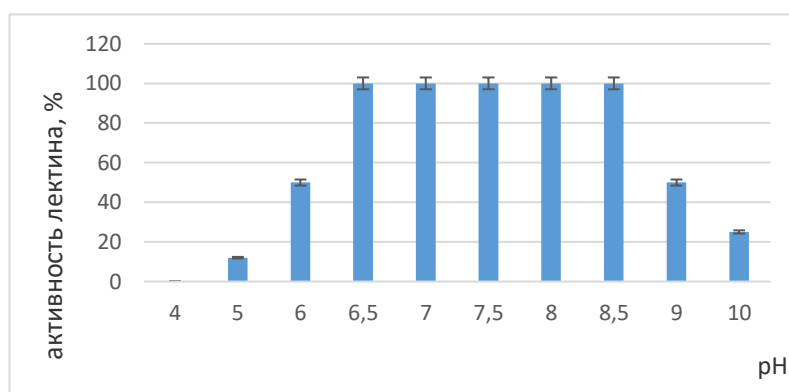


Рисунок 7.2 – Диапазон pH-значений активности лектина препарата Барьер

Стабильность лектина препарата Барьер сохранялась в пределах pH от 6,5 до 8,5 в течение 1 ч (таблица 7.4). Снижение активности лектина на 50 % наблюдалось при его инкубации с pH 6,0 и pH 9,0. При выдерживании лектина в буфере со значением pH 5,0 или pH 10,0 белок был не стабилен и полностью инактивировался.

Таблица 7.4 – Влияние pH на активность лектина препарата Барьер

Барьер	pH – оптимум (pH 50%)	Время полуинактивации, ч								
		5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	10
	6,5-8,5 (6,0-9,0)	нс	1	ст	ст	ст	ст	ст	1	нс

*Примечание: * pH 50 % – диапазон pH-значений, при которых титр активности лектина на 50 % выше от наибольшего значения; ст – белок стабилен при инкубации в течение 60 мин; нс – белок не стабилен и инактивируется за 5 мин.*

Таким образом, лектин препарата Барьер проявлял свою активность и стабильность в широком диапазоне температур (5-50 °С), но был чувствителен к изменению рН. Диапазон рН и рН-стабильности был в районе нейтральных или слабощелочных значений (рН 6,5-8,5).

Полученные данные согласуются с результатами работ по характеристике лектинов микромицетов других родов, в которых отмечалась способность лектинов функционировать в широком диапазоне температур и рН среды [216, 217].

7.6 Устойчивость препарата Барьер к хлориду натрия и к ионам металлов

В литературе представлено значительное количество работ, связанных с засолением почв [218]. Представляло интерес определить изменение титра активности препарата Барьер при внесении в реакционную среду солевого раствора NaCl в концентрациях 0,5-1,0 г на 100 мл (таблица 7.5).

Таблица 7.5 – Влияние солевого раствора на активность лектина препарата Барьер

Варианты опыта	Концентрация раствора NaCl, %	Титр активности препарата Барьер
Контроль	0	2048
Реакционная смесь с NaCl	0,5	2048
-	0,75	2048
-	1,0	2048

Результаты исследований показали, что титр активности лектина препарата Барьер соответствовал показаниям активности лектина в исходной реакционной среде и не менялся по мере добавления в нее NaCl (таблица 7.5). Сохранение активности лектина у препарата Барьер при внесении соли в реакционную смесь говорит о солеустойчивости данного препарата.

При приготовлении лабораторных образцов препарата в состав раствора дополнительно вводили азид натрия в малой концентрации (<0,1 %) в качестве

консервирующего компонента. Азид натрия добавляли на стадии приготовления готового раствора препарата, растворяя его в буферной системе и далее фасуя уже консервированный раствор во флаконы. Использование азиды натрия позволяет снизить риск микробного зарастания препарата при розливе в условиях лабораторного помещения, не оснащённого промышленной асептической линией.

Влияние ионов металлов на активность лектина препарата Барьер определяли в растворах различных солей металлов. В экспериментах использовали растворы FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , MgCl_2 , MnCl_2 , KCl на основе 20 мМ Трис- HCl буфера, pH 7,2. Контролем служил титр активности лектина в стандартных условиях без внесения в реакционную среду ионов металлов (таблица 7.6).

Результаты исследований показали, что лектин препарата Барьер не терял своей гемагглютинирующей активности с эритроцитами при инкубации в буферных растворах солей двухвалентных ионов металлов, в том числе и тяжелых металлов, а при концентрациях 10-20 мМ, в присутствии Mn^{2+} и Zn^{2+} даже наблюдалось повышение титра активности Барьера. При более низких концентрациях данных ионов, титр активности оставался на уровне контрольного варианта.

Таблица 7.6 – Влияние ионов металлов на активность препарата Барьер

Растворы металлов	Титр активности лектина				
	20 мМ	10 мМ	5 мМ	2,5 мМ	1,25 мМ
MgCl_2	2048	2048	2048	2048	2048
MnCl_2	4096	4096	2048	2048	2048
KCl	2048	2048	2048	2048	2048
FeSO_4	2048	2048	2048	2048	2048
ZnSO_4	4096	4096	2048	2048	2048
CuSO_4	2048	2048	2048	2048	2048
контроль	2048				

Следовательно, препарат Барьер сохраняет свою активность при контакте с ионами различных металлов. Повышение гемагглютинирующей активности

лектина можно объяснить тем, что данные ионы металлов, по-видимому, принимают участие в организации сайта связывания лектинов, усиливая их адгезионную способность.

7.7 Общая характеристика и исследование препарата Барьер в полевых условиях

В настоящее время производство лектинов сосредоточено преимущественно в США, где препараты подлежат строгой регистрации в соответствии с требованиями ЕС 1107/2009 (ЕС) или EPA (США). Данные регламенты не распространяются напрямую на биопрепараты, предназначенные для сельского хозяйства, но содержат нормативы, на которые ориентируются, учитывая потенциальный контакт используемых препаратов с сельскохозяйственными культурами пищевого назначения.

Анализ результатов исследований показал, что препарат Барьер по своим характеристикам соответствует основным необходимым требованиям для биологических препаратов, используемых в сельском хозяйстве (таблица 7.7).

Таблица 7.7 – Характеристика препарата Барьер

Основные свойства	Значения
Концентрация	14,50-16,00 г/л
Титр активности	1024-2048 ед.
Внешний вид	Прозрачная жидкость без осадка
Токсичность	ИМ 1,3-1,8
Диапазон температуры стабильности	5-50 °С
Диапазон рН-стабильности	6,5-8,5
Солеустойчивость	0,5-1 % NaCl
Устойчивость к ионам металлов	1,25-20 мМ

*Примечание: * Азид натрия применяется только в стадии получения опытных образцов и не является фактором, определяющим биологическую активность препарата, которая обусловлена содержанием лектина *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039. При переводе технологии в промышленный масштаб возможно снижение концентрации азид натрия либо подбор альтернативного консерванта с меньшей токсичностью, что не повлияет на основную биотехнологическую схему получения лектина.*

Исследование влияния препарата Барьер на горох сорта «Усатый кормовой» в полевых условиях проводили мелкоделяночным способом. Площадь делянок 5 м², повторность опыта 3-х кратная. Форма делянок 1:3. Почва – чернозем. Культура предшественник – луговые травы. рН почвы – 6,4.

В опыте изучалось влияние нового препарата Барьер на всхожесть, рост и развитие гороха сорта «Усатый кормовой». Посев проводили Рядовым (строчным) методом. Ряды при посеве гороха располагали в пределах 10-15 см друг от друга. Посев семян проводили на глубину 4-6 см.

В экспериментах были исследованы 3 варианта опытов:

1. Контролем служили семена гороха без протравливания и без обработки в период вегетации растений.

2. Барьер: проводилась предпосевная обработка семян гороха раствором Барьера в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 ч, а затем этим же раствором проводилась обработка в период вегетации.

3. Циркон: проводилась предпосевная обработка семян гороха раствором Циркона в концентрации 25 мкг/мл, а затем раствором циркона в период вегетации.

Результаты исследований показали, что применение изучаемых препаратов способствовало повышению полевой всхожести семян гороха на 10,8-13,6 % и на 10,1-11,8 % увеличивалась сохранность растений к уборке (таблица 7.8).

Таблица 7.8 – Действие биопрепаратов на полевую всхожесть и сохранность растений (n = 3)

Варианты опыта	Полевая всхожесть, %	Густота стояния растений гороха, шт./м ²		Сохранность растений к уборке, %
		всходы	перед уборкой	
Контроль	72,0	108	68	62,8
Барьер	85,6	126	94	74,6
Циркон	82,8	122	89	72,9

Обработка семян и растений способствовала усилению образования вегетативной массы растений, увеличению формирования количества бобов и семян на растениях и, следовательно, получению более высокой урожайности культуры по сравнению с контрольным вариантом (таблица 7.9).

Таблица 7.9 – Влияние биопрепаратов на структуру и урожайность гороха «Усатый кормовой»

Варианты опыта	Количество				Масса	Урожайность г/м ²
	Растений к уборке, шт./м ²	Бобов (стручков) на растении, шт.	Семена в бобе, шт.	Семян на растении, шт.	Семена с растения, г	
Контроль	68	3,8	5,0	19,0	3,24	314
Барьер	94	4,2	5,6	23,5	3,99	385
Циркон	89	4,0	5,6	22,4	3,80	365

Определение количества сохранившихся растений, образовавшихся бобов и семян, а также по урожайности культуры, лучшие результаты были получены при обработке семян гороха и растений препаратом Барьер. Урожайность выросла на 22,6 % относительно контроля. Использование Циркона дало меньший прирост урожайности на 16,5 %.

Полученный препарат Барьер показал, что он обладает высокой биологической активностью, как стимулятор роста растений и как средство, обеспечивающее сохранность растений. Полученные результаты позволяют рекомендовать данный комплексный препарат для растениеводства.

7.8 Перспективы использования препарата Барьер в медицинских целях

Поскольку высокие концентрации лектина препарата Барьер (80 мкг/мл) тормозили всхожесть семян растений, было решено проверить их действие на отдельные виды фирмикутных и грациликутных бактерий.

Данная концентрация лектина препарата Барьер была использована при изучении его действия на представителей фирмикутных и грациликотных бактерий, таких как *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter agilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* [219].

Исследование антибактериальной активности препарата Барьер проводилось при изучении динамики роста культур в течение 24-30 ч в мясопептонном бульоне (МПБ). Внесение препарата в концентрации 80 мкг/мл в питательную среду культивирования проводили на первых минутах роста бактерий (рисунок 7.3).

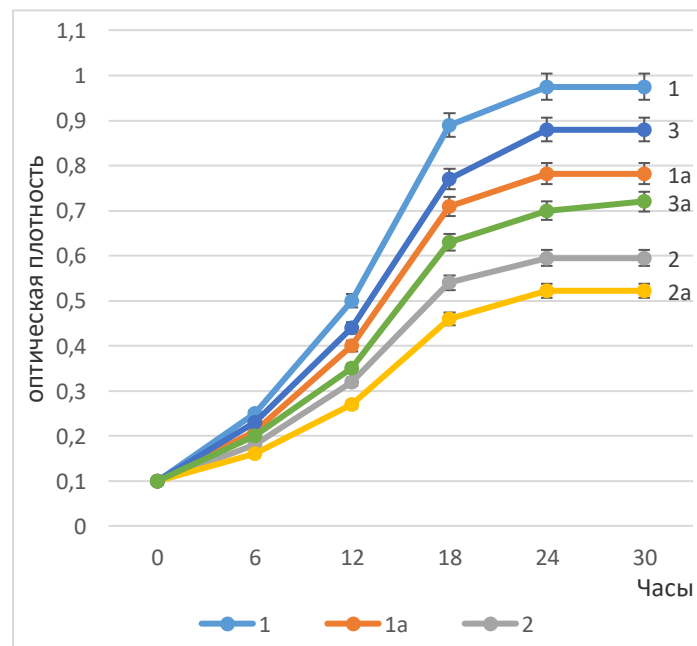


Рисунок 7.3 – Влияние препарата Барьер в концентрации 80 мкг/мл на фирмикутные бактерии: 1 – *A. agilis*, 1a – *A. agilis* + лектин; 2 – *B. cereus*, 2a – *B. cereus* + лектин; 3 – *B. subtilis*, 3a – *B. subtilis*+ лектин

Результаты исследований показали, что препарат Барьер в концентрации 80 мкг/мл незначительно ингибировал рост фирмикутных бактерий. Так, рост кокковой формы бактерий *A. agilis* при добавлении препарата Барьер в среду

культивирования снижал прирост биомассы – в 1,3 раза по сравнению с ростом штамма без внесения препарата. Для бацилярных форм – *B. cereus* и *B. subtilis*, снижение биомассы было еще меньше – в 1,1-1,2 раза.

Более активное влияние препарата Барьер на снижение роста бактерий наблюдалось и при внесении концентрации 80 мкг/мл в среду культивирования грациликотных бактерий (рисунок 7.4). Так, рост биомассы у штаммов *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* при внесении лектина снижался в 1,2 раза, а *E. coli* – в 1,3 раза.

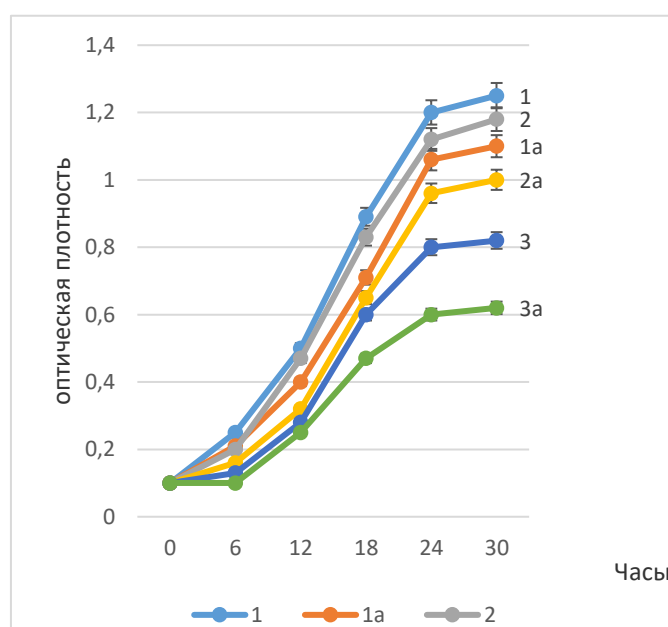


Рисунок 7.4 – Влияние препарата Барьер в концентрации 80 мкг/мл на грациликотные бактерии: 1 – *P. aeruginosa*, 1a – *P. aeruginosa* + лектин; 2 – *K. pneumoniae*, 2a – *K. pneumoniae* + лектин; 3 – *E. coli*, 3a – *E. coli* + лектин

Таким образом, препарат Барьер, в концентрации 80 мкг/мл, проявлял антимикробное действие по отношению к фирмикутным и грациликотным бактериям. Можно предположить, что увеличение концентрации лектина в растворе, будет приводить к более эффективному снижению роста микробных клеток.

ГЛАВА 8. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАРЬЕР

8.1 Режим работы проектируемого производства во времени

Технико-технологическое обоснование предлагаемого проекта выполнялось на основе данных специализированной научно-технической литературы по проектированию биотехнологических производств [212–214]. При выборе производительности исходили из мощности ферментёра, который рассматривается как ведущее звено технологической линии и задаёт ритм работы всего производства.

Производственный участок предполагается эксплуатировать в непрерывном круглосуточном режиме, поэтому для оценки возможного объёма выпуска был определён эффективный фонд времени работы оборудования $T_{эф}$. Его рассчитывали, как разность между номинальным календарным фондом и суммарным временем, приходящимся на регламентированные остановки:

$$T_{эф} = T_{ном} - T_{рем} - T_{ост},$$

где $T_{ном}$ – номинальный фонд времени, дней;

$T_{рем}$ – простои в планово-предупредительном ремонте, дней;

$T_{ост}$ – технологические остановки, дней;

$$T_{эф} = 365 - 185 = 180 \text{ дней.}$$

Согласно расчётам материального баланса, один производственный цикл глубинного жидкофазного культивирования *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039 длительностью 6 суток обеспечивает получение 3,62 кг биомассы и 1,45 кг неочищенного лектина. При работе в течение 180 дней в году это соответствует 30 полным производственным циклам ($180 / 6$). На основании этих данных оценивали годовой выпуск готового продукта P_r по классическому соотношению:

$$P_r = a \cdot b,$$

где a – выход препарата Барьер за 1 цикл, кг; b – количество циклов.

Биомассы: $P_6=3,62 \cdot 30=108,6$ кг.

Неочищенного лектина: $P_6=1,45 \cdot 30=43,5$ кг.

8.2 Планирование капитальных затрат

Подобрана компоновка и проведен расчет общей площади цеха по производству биомассы и неочищенного лектина, которая составляет 300 м². Стоимость аренды помещения в месяц составляет 0,18 тыс. руб./м², следовательно, аренда цеха площадью 300 м² в год составит 648 тыс. руб. Амортизация начисляется согласно п. 1 ст. 258 Налоговый кодекс Российской Федерации в количестве 2,5 % от суммы капитальных затрат в год.

Таблица 8.1 – Расчет стоимости оборудования

Наименование оборудования	Марка	Кол-во, шт.	Стоимость оборудования		Амортизационные отчисления	
			цена единицы	Σ	норма, %	сумма,
Ферментер	Bailun	1	8 500 000	8 500 000	10	850 000
Варочный котел	ВКЭ-500	1	400 000	400 000	10	40 000
Машина для мытья овощей	МТМ-600К	1	75 000	75 000	10	7500
Центрифуга	Avanti J-26XP	1	7 000 000	7 000 000	10	700 000
Ультрафильтрационная установка		1	800 000	800 000	10	80 000
Воздушный компрессор	ET- Compressors	1	1 400 000	1 400 000	10	140 000
Парогенератор	Ural-Power	1	1 000 000	1 000 000	10	100 000
Чиллер	Planer	1	2 000 000	2 000 000	10	200 000
Стерилизатор	Biobase	1	800 000	800 000	10	80 000
Шейкер-инкубатор	BIOBASE	1	675 000	675 000	10	67 500
Итого:	-	-	-	22 661 300	10	2 185 000
Монтаж оборудования	-	-	-	1 200 000	-	-
Всего:	-	-	-	23 861 300	10	2 386 130

На основании проведенных расчетов составлена сводная смета капитальных

затрат производства (таблица 8.2).

Таблица 8.2 – Сводная смета капитальных затрат производства

Элементы основных фондов	Общая стоимость, руб.	% к итогу
Здания и сооружения	648 000*	2,73
Оборудование	23 861 300	97,27
Итого:	23 861 300 руб (без учета аренды)	100

*Примечание: * в год*

8.3 Планирование материально-технического обеспечения

На основании материального баланса и цен за 1 кг сырья была рассчитана стоимость сырья, необходимого для получения 1 кг биомассы. Транспортно-заготовительные расходы ТЗ, тыс. руб. приняты в количестве 20 % от стоимости сырья [215].

При обращении с азидом натрия на стадии приготовления лабораторных образцов соблюдались требования химической безопасности: приготовление раствора осуществляется в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты, а фасовка — в герметичную тару с минимизацией контакта персонала с раствором. Отходы, содержащие азид натрия, подлежат отдельному сбору и последующей утилизации в соответствии с действующими санитарными нормами.

Результаты расчётов количества и стоимости сырья для получения биомассы и неочищенного лектина представлены в таблице 8.3.

Затраты на сырье СР, тыс. руб., рассчитываются по формуле:

$$СР=(ДЗ\cdot СС)/1,$$

где ДЗ – доля от общих затрат на производство продукта, %;

СС – стоимость сырья для проектируемого производства, тыс. руб.

Таблица 8.3 – Расчёт количества и стоимости сырья для получения биомассы и неочищенного лектина на 1 цикл

Наименование сырья	Цена за единицу, руб/кг	Норма расхода, кг	Стоимость, руб.
Картофель	30	20	600
Вода питьевая	0,03	105	3,15
Глюкоза	500	2	1000
Аспарагиновая кислота	2000	0.005	10
Транспортно-заготовительные расходы (20 %)	-	-	322,63
Итого:			1 613,15

Расчет расходов на сырьё СР, тыс. руб. при производстве 1 кг готовых продуктов с учетом их различного долевого распределения (таблица 6.1):

$$\text{Биомасса: СР} = (100 \cdot 1\,935,78) / 100 = 1\,935,78 / 1,45 \text{ кг} = \mathbf{1\,335 \text{ руб/кг}}$$

8.4 Расчёт потребности в воде и электроэнергии

Расчет потребности воды и электроэнергии проведен на основании [211-213]. Стоимость используемой воды K_6 , тыс. руб., в год, необходимой для производства готовых продуктов рассчитывается по формуле:

$$K_6 = P_в \cdot T_в,$$

где $P_в$ – потреблённое количество воды в год, м³;

$T_в$ – тариф за воду, тыс. руб./м³.

$$K_6 = 3,7 \cdot 0,03 = 0,111 \text{ тыс. руб.}$$

Стоимость используемой электроэнергии K_9 , тыс. руб., в год, необходимой для производства готовых продуктов рассчитывается по формуле:

$$K_9 = P_э \cdot T_э,$$

где $P_э$ – потреблённое количество электроэнергии в год, кВт·ч;

T_3 – тариф за электроэнергию, тыс. руб./кВт·ч.

$$K_3 = 43200 \cdot 0,0067 = 289,44 \text{ тыс. руб.}$$

Примечание: приведённое водопотребление (3,7 м³/год) соответствует только воде, входящей в состав питательной среды. Техническая вода (мойка оборудования, охлаждение, парогенератор) не включена в баланс, так как её вклад в себестоимость продукта не превышает 0,1 % и не влияет на итоговые показатели.

Стоимость используемого водоснабжения K_6 , тыс. руб., и электроэнергии K_3 , тыс. руб., на выработку 1 кг биомассы/неочищенного лектина, рассчитываются по формуле:

$$K_T = ((\sum T \cdot D) / 100) / П,$$

где $\sum T$ – годовая сумма расходов на водоснабжение/электроэнергии, тыс. руб.;
 D – доля потребления водоснабжения/электроэнергии для производства готового продукта, %;
 $П$ – годовой выпуск готовой продукции, кг.

Расчет расходов на водоснабжения K_6 , тыс. руб., и электроэнергии K_3 , тыс. руб., при производстве 1 кг готовых продуктов с учетом их различного долевого распределения составляют:

Расход на водоснабжение K_6 , тыс. руб./кг:

$$\text{Биомасса: } K_6 = (0,111 \times 0,714) / 108,6 = 0,0793 / 108,6 = 0,00073 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Неочищенный лектин: } K_6 = ((0,111 \cdot 28,6) / 100,0) / 43,5 = 0,001 \text{ тыс. руб./кг.}$$

Расход на электроэнергию K_3 , тыс. руб./кг:

$$\text{Биомасса: } K_3 = ((289,44 \cdot 71,4) / 100,0) / 108,6 = 1,9 \text{ тыс. руб./кг.}$$

$$\text{Неочищенный лектин: } K_3 = (289,44 \times 0,286) / 43,5 = 1,90 \text{ тыс. руб./кг.}$$

Результаты расчёта воды и электроэнергии для производства биомассы и неочищенного лектина представлены в таблице 8.4.

Таблица 8.4 – Расчёт количества и стоимости воды и электроэнергии для производства

Параметр	Водоснабжение	Электроэнергия
Потребленное количество за год	3,7 м ³	43200 кВт·ч
Тариф	0,03 тыс. руб./м ³	0,0067 тыс. руб./кВт·ч
Потребление в год, тыс. руб.	0,111	289,44
Для выработки 1 кг биомассы, тыс. руб.	0,00073	1,90
Для выработки 1 кг неочищенного лектина, тыс. руб.	0,001	1,90

Примечание: Расчет выполнен с учетом долевого распределения энергозатрат: 71,4 % — на культивирование и получение биомассы; 28,6 % — на выделение, концентрирование и стабилизацию неочищенного лектина (формулы 6.6, раздел 8.4).

8.5 Расчёт численности и фонда заработной платы персонала

Расчет численности персонала и фонда заработной платы проведен на основании [215]. Баланс рабочего времени среднесписочного рабочего приведен в таблице 8.5.

Таблица 8.5 – Расчёт численности и фонда заработной платы персонала

Показатель	Количество
Календарное количество дней	365
Выходные и праздничные дни	118
Номинальный фонд рабочего времени, дни	247
Неявки на работу, всего, дни	32
в том числе:	
- очередной и дополнительный отпуск	28
- отпуск по учебе	1
- болезни	2
- выполнение государственных обязанностей	0,5
- прочие неявки, разрешенные законом	0,5
Явочный фонд рабочего времени, дни	215
Номинальная продолжительность рабочего дня, ч	8
Предпраздничные сокращенные дни (4 дня × 1 ч)	4
Эффективный фонд рабочего времени одного рабочего, ч	1716

Расчет выполнен на основании производственного календаря РФ на 2026 год (Постановление Правительства РФ от 24.09.2025 № 1466). Фонд

заработной платы рассчитан, исходя из фиксированных окладов и не зависит от эффективного фонда рабочего времени.

Расчёт фонда заработной платы персонала с учётом отчислений в количестве 30 % представлен в таблице 8.6.

Таблица 8.6 – Фонда заработной платы персонала с учётом отчислений 30 %

Категории работающих	Численность, чел.	Годовой фонд зарплаты,
Рабочие	5	4 400 000,0
Руководители и специалисты	1	1 600 000,0
Итого:	6	6 000 000

8.6 Расчет сметы себестоимости готовой продукции

Общепроизводственные расходы включают амортизацию оборудования, затраты на его содержание, ремонт, а также прочие расходы, связанные с эксплуатацией производственных мощностей. Расчёт выполнен с учётом данных по амортизации, аренде и затратам на обслуживание производства, полученных в предыдущих разделах главы 8 (таблица 8.7).

Таблица 8.7 – Калькуляция себестоимости 1 кг препарата Барьер

Статья затрат	Сумма, тыс. руб/кг	%
I. Материальные затраты		
– Сырьё (картофель, глюкоза, аспарагиновая кислота)	1,34	1,0
– Электроэнергия	1,90	1,4
– Водоснабжение	0,00073	~0
Итого по статье I	3,24	1,4
II. Заработная плата с отчислениями	137,93	51,0
III. Амортизация оборудования	$2\,386,13 / 43,5 = 54,85$	20,3
IV. Аренда помещения	14,90	5,5
V. Общепроизводственные расходы	2,50	0,9
VI. Прочие расходы (5% от I–V)	$(3,24+137,93+54,85+14,90+2,50) \times 0,05 = 10,67$	3,9
Полная себестоимость (С)	224,1	100

Примечание. Значения приведены в расчёте на 1 кг неочищенного лектина (препарата Барьер) с учётом долевого распределения энергозатрат между стадиями получения биомассы и выделения лектина (раздел 8.4).

На основании данных по материальным затратам, расходу электроэнергии и воды, фонду заработной платы, амортизационным и прочим расходам рассчитана полная себестоимость 1 кг препарата Барьер. Расчёт выполнен для годовой производительности 43,5 кг препарата Барьер, получаемого при глубинном культивировании штамма *A. alternata* ВКПМ F-2039 и последующем выделении неочищенного лектина.

8.7 Расчет себестоимости единиц готовой продукции препарата Барьер на основе высокоактивных лектинов *Alternaria alternata* ВКПМ F-2039

Для сельскохозяйственного применения лектинов корректно ориентироваться на стоимость неочищенных или частично очищенных белковых препаратов, пригодных для масштабного использования.

В качестве исходного ориентира для расчёта была принята минимальная рыночная стоимость неочищенного лектина на уровне 750 тыс. руб. за 1 кг продукта, что соответствует нижней границе оценки стоимости белковых препаратов аналогичного назначения в условиях ограниченного рыночного предложения. Данное допущение использовано не для утверждения о фактическом наличии массового рынка неочищенных лектинов, а в качестве расчётной базы для оценки экономической целесообразности производства препарата Барьер.

Цена продукции определяется с учётом рентабельности 60 %:

$$Ц = C \times (1 + 0,6) = 224,1 \times 1,6 = 375 \text{ тыс. руб./кг}$$

С учётом конкурентоспособности и социальной значимости продукта в дальнейших расчётах принимаем цену 375 тыс. руб./кг. Это значение более чем в 1,5 раза выше расчётной себестоимости, обеспечивает высокую рентабельность.

При оценке экономической эффективности препарата Барьер учитывается

расчётная цена 1 кг продукта и стоимость предпосевной обработки семян. Рабочая концентрация лектина в препарате Барьер составляет 10 мкг/мл, а норма расхода рабочей жидкости составляет 10 л на 1 т семян. При условии, что концентрация – это отношение массы семян к объёму препарата, получаем

$$\text{Масса} = \text{концентрация} \times \text{объём}$$

$$\text{Масса (г)} = 0,00001 \text{ г/мл} \times 10\,000 \text{ мл} = \mathbf{0,1 \text{ г на } 10 \text{ л}}$$

Расход неочищенного лектина на 1 т семян составляет всего 0,1 г, то есть препарат вносится в микродозах при проявлении ростостимулирующего и защитного эффекта.

Сравнительная оценка стоимости препаратов для обработки семян представлена в таблице 8.8.

Таблица 8.8 – Сравнительная оценка стоимости препаратов для обработки семян

Препарат	Расход на 1 т семян	Цена за единицу товара	Стоимость обработки 1 т в руб.
Циркон (НЭСТ М, Россия)	20 мл (1 мл на 50 кг семян)	5 500 руб./л	110 руб.
Эпин-Экстра (НЭСТ М, Россия)	20 мл	4 500 руб./л	90 руб.
Фитоспорин-АС (Бактоген, Россия)	100–200 мл	~200 руб./л	20–40 руб.
«Барьер»	0,1 г	375 000 руб./кг	56 руб.

На основе годовой производительности (43,5 кг концентрата лектина), полной себестоимости единицы продукции и установленной цены (375 тыс. руб./кг) рассчитаны основные финансовые показатели проекта (таблица 8.9).

Таблица 8.9 – Финансовые показатели проекта

Показатель	Значение
Годовой выпуск, кг	43,5
Выручка, тыс. руб.	$43,5 \times 375 = 16\,312,5$
Полная себестоимость годового выпуска, тыс. руб.	$43,5 \times 224,1 = 9\,748,4$
Прибыль до налогообложения, тыс. руб.	$16\,312,5 - 9\,748,4 = 6\,564,1$
Налог на прибыль (20%), тыс. руб.	$6\,564,1 \times 0,2 = 1\,312,8$
Чистая прибыль, тыс. руб.	5 251,3
Рентабельность продукции, %	$(5\,251,3 / 9\,748,4) \times 100 \approx 54\%$

Срок окупаемости капитальных вложений:

$$T_{\text{ок}} = \frac{\text{CAPEX}}{\text{ЧП}} = \frac{23\,861,3}{5251,3} \approx 4,5 \text{ года}$$

Полученные показатели (срок окупаемости около 4,5 года, рентабельность 54 %) являются удовлетворительными для капиталоемкого биотехнологического производства, особенно с учётом высокой социально-экономической значимости импортозамещающего продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выделены и идентифицированы природные изоляты грибов рода *Alternaria*. Штамм с наиболее высокой способностью к синтезу лектинов депонирован во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов – *A. alternata* ВКПМ F-2039.

2. Установлено, что максимальное накопление биомассы 36,2 г/л и лектинов с активностью 2048 ед. наблюдается на 6-7 сутки при погруженном культивировании гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 на картофельно-глюкозной среде с добавлением стимулирующей добавки – аспарагиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл.

3. Показано, что лектины микромицета *A. alternata* ВКПМ F-2039 обладают ростостимулирующим действием на семена зерновых и бобовых культур (пшеница, горох). Лучшие показатели по всхожести семян, росту и развитию растений наблюдались при обработке лектинами в концентрации 10 мкг/мл на 1 кг семян.

4. Доказана способность лектинов *A. alternata* ВКПМ F-2039 к защите растений от фитопатогенных микроорганизмов, а именно от *A. solani* и *F. oxysporum*. Необходимая концентрация для биофунгицидного действия на растения – 10 мл препарата (содержание лектинов 10 мкг/мл) на 1 кг семян.

5. Доказана эффективность и целесообразность производства нового созданного препарата комплексного действия для растениеводства – Барьер. Препарат активен в диапазоне 5-50 °С, рН 6,5-8,5, устойчив к хлориду натрия (0,5-1,0 %) и ионам металлов (1,25-20 мМ). Уровень мутагенной активности 1,8, препарат не токсичен. Установлены его основные нормы качества с титром активности 2048 ед.

6. Проведена разработка биотехнологии получения препарата Барьер с производительностью 43,5 кг в год. Рекомендовано обрабатывать семена перед посевом и в период вегетативного роста растений.

7. Согласно технико-экономическим расчетам установлено, что себестоимость 1 кг лектина составляет 224 тыс. руб., рыночная цена принята 375 тыс. руб./кг. Цена обработки 1 т семян составляет 56 руб. Рентабельность продукции — 54 %, срок окупаемости капитальных вложений — 4,5 года. Это позволяет рекомендовать разработанную биотехнологию для промышленного внедрения в агропромышленном секторе.

Представленная в диссертационной работе биотехнология культивирования гриба *A. alternata* ВКПМ F-2039 может считаться стартовой для дальнейшего создания на основе биомассы и лектинов продуктов, востребованных в сельском хозяйстве и медицине. Поскольку лектины относятся к соединениям широкого спектра действия, то на их основе могут быть созданы не только эффективные препараты для растениеводства, но и лекарственные препараты, обладающие высокой иммуномодулирующей, противовирусной, противоопухолевой активностями, способные решить проблемы импортозамещения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганибал, Ф.Б. Полифазный подход в таксономии грибов / Ф.Б. Ганибал // Журнал общей биологии. – 2021. – Т.82. - №3. - С. 175-187.
2. Далинова, А.А. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор) / А. А. Далинова, Д. Р. Салимова, А. О. Берестецкий // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т.56. - № 3. - С. 223-241.
3. Ганибал, Ф.Б. Ассоциированные с ячменем микромицеты и их значимость как возбудителей болезней в России / Ф.Б. Ганибал, Е.В. Полуэктова, Я.В.Лукиянец и др. // Вестник защиты растений. – 2023. – Т.106. - №4. - С.172-186.
4. Кобзарь, В.Н. Доминантные споры грибов *Cladosporium* и *Alternaria* в воздухе г. Каракол / В.Н. Кобзарь, К.Б. Осмонбаева // Российский аллергологический журнал. – 2025. – Т. 22. - № 3. - С. 267–276.
5. Халаева, В.И. Видовое разнообразие грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями картофеля / В.И. Халаева, И.Г. Волчкевич, А.В. Патракеева // Защита растений. – 2023. – Т.1. - N47. - С. 151-168.
6. Kokaeva, L.Y. Early blight (EB) is a destructive disease affecting potato and tomato plants in Russia, caused by a heterogeneous group of plant pathogenic *Alternaria* fungi / L.Y. Kokaeva // Diversity. – 2022. – Vol. 14. - № 8. – 685 p. <https://doi.org/10.3390/d14080685>
7. Gavin, H. T. Microbial Musing – Winter // Microbiology. – 2022. – Vol. 168. – N 12. - P. 1-3. doi:10.1099/mic.0.001310
8. Кондрашева, К.В. Успехи изучения биоактивных свойств эндофитных грибов Узбекистана / К.В. Кондрашева, Д.М. Рузиева, С.М. Насметова и др. // Published September. – 2025. – Vol. 1. - С. 175-181.
9. DeMers, M. *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen // Microbiology. – 2022. – Vol. 168. - N3. - 1153. - P. 1-15.

10. Гагкаева, Т.Ю. Черный зародыш пшеницы: реальность против / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова, А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал // Вестник защиты растений. - 2025. - Т. 108. - №4. - С. 236–244.
11. Sajad, A. Revisiting *Alternaria*-host interactions: New insights on its pathogenesis, defense mechanisms and control strategies / A. Sajad // *Scientia Horticulturae*. – 2023. – Vol.322. - N1. - P. 1-14. <https://doi.org/10.1015/j.scienta.2023.112424>
12. Берестецкий, А.О. Метаболитные профили и биологическая активность экстрактов культуры гриба *Alternaria sonchi* S-102 при различных способах его культивирования / А.О. Берестецкий, А.А. Далинова, Н.С. Волосатова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. - № 3. - С. 271-281.
13. Кононенко, Г.П. Токсины микромицетов в генеративных органах растений семейства Fabaceae / Г.П. Кононенко, А.А. Буркин // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т.56. - №5. - С.968-978.
14. Duke S.O. Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide / Eds. N.E. Korres, N.R. Burgos, S.O. Duke / Boca Raton : CRS Oress, 2019.- 663 p.
15. Конев, А.Д. Альтернариатоксины как угроза здоровью: цитотоксические эффекты / А.Д. Конев, И.Б. Седова, В.А. Тутельян // Вопросы питания. – 2025. – Т.94. - № 6.- С. 47-57.
16. Аксенов, И.В. Альтернариатоксины как фактор риска для здоровья населения / И.В. Аксенов, И.Б. Седова, З.А. Чалый, В.А. Тутельян // Анализ риска здоровью.-2023. - № 4. - С. 146-157. doi: 10.21668/health.risk/2023.4.14
17. Седова, И.Б. Альтернариатоксины в продуктах переработки томатов, реализуемых на российском рынке / И.Б. Седова, З.А. Чалый, У.В. Иванова, В.А. Тутельян // Вопросы питания. – 2024. – Т.93. - №1. - С. 103-111.
18. Bhagat, J., Cholinesterase inhibitor (*Altenuene*) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: optimization, purification and characterization / J. Bhagat, A. Kaur,

- R. Kaur, et al. // J Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 121 / - P. 1015-1025. doi: 10.1111/jam.13192.
19. Pinto V.E.F., Patriarca A. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols / Eds. A. Moretti, A. Susca. NY: Springer Science+Business Media LLC, 2017.- 379 p.
20. Romero, D.C.J. Interacting Abiotic Factors Affect Growth and Mycotoxin Production Profiles of *Alternaria* Section *Alternaria* Strains on Chickpea-Based Media / D.C.J., Romero, M.J. Nichea, E. Cendoya, et al. //Pathogens.- 2023. - Vol. 12. - N4. - P. 565-574. doi: 10.3390/pathogens12040565.
21. Tian, J. Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* species Sami01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities / J. Tian, L. Fu, Z. Zhang et al // Natural Product Research. – 2017. – Vol. 31. - N4. - P.387-396.
22. Louro, H A., Characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health / H. Louro, A. Vettorazzi , A.L.de Cerain, et al. // Arch Toxicol. – 2024. – Vol.98. - P. 425-469. doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
23. Ismail, A.M. Mycotoxins from tomato pathogenic *Alternaria alternata* and their combined cytotoxic effects on human cell lines and male albino rats / A.M. Ismail, E.S.Elsheawy , S.M. El-Ganainy , et al. // J Fungi (Basel). – 2023. – Vol. 9. - N3. - P.282-294. doi: <https://doi.org/10.3390/jof9030282>
24. Solhaug, A. Mechanisms of Action and Toxicity of the Mycotoxin Alternariol: A Review / A. Solhaug, G.S. Eriksen , J.A. Holme // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2016. – Vol. 119. - № 6. - P. 533-539.
25. Grover, S. The *Alternaria alternata* mycotoxin alternariol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation / S. Grover, C.B. Lawrence // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol.18. - N7. - 1577. - P. 1-12. <https://doi.org/10.3390/ijms18071577>
26. Del Favero, G. Functional impairment triggered by altertoxin II (ATXII) in intestinal cells in vitro: Cross-talk between cytotoxicity and mechanotransduction /

- G. Del Favero, R.Zaharescu, D. Marko //Arch. Toxicol. – 2018. – Vol.92. - №12. - P. 3535-3547. doi: 10.1007/s00204-018-2317-6.
27. Del Favero, G. Structural Similarity with Cholesterol Reveals Crucial Insights into Mechanisms Sustaining the Immunomodulatory Activity of the Mycotoxin Alternariol / G. Del Favero, R.V. Mayer, L. Dellafiora et al // Cells. – 2020. – Vol.9. - N4. - P. 847-858. doi: 10.3390/cells9040847.
28. Asam, S. Determination of tenuazonic acid in human urine by means of a stable isotope dilution assay / S. Asam, K. Habler, M. Rychlik // Anal. Bioanal. Chem. – 2013. – Vol. 405 - № 12. – P. 4149–4158. doi: 10.1007/s00216-013-6793-5.
29. Schuchardt, S. Combined toxicokinetic and in vivo genotoxicity study on Alternaria toxins /S. Schuchardt, C. Ziemann, T. Hansen, // EFSA J. – 2014. – Vol. 11. - N11. – E - 679. - 130p. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-679>
30. Берестецкий, Ф.Б. Спектр биологической активности грибов рода *Alternaria*, выявленных в филлосфере травянистых растений / А.О. Берестецкий, Ф.Б. Ганнибал, Е.В. Минкович и др. // Микробиология. – 2018. – Т. 87, N.6. - С. 706-717.
31. Петрова, Л. Фитотоксины и их влияние на растения /Л. Петрова, М.Сидорова // Фитопатология. – 2020. – Т.62 - № 1. - С. 55-65.
32. Salimova, D.R. Entomotoxic activity of the extracts from the fungus, *Alternaria tenuissima* and its major metabolite, tenuazonic acid /A.A. Dalinova, V.R. Dubovik, et al. // Journal of Fungi. - 2021. - Vol. 7. - N. 9. - P. 774-782.
33. Коваленко, Н.М. Устойчивость к пиренофорозу (*Pyrenophora tritici-repentis*) у сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), возделываемых на территории Тамбовской области / Н.М. Коваленко, Ю.В. Зеленева, В.П. Судникова // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т.58. - № 5. - С. 915-929. doi: 10.15389/agrobiology.2023.5.915rus

34. Далинова, А.А. Вторичные метаболиты гриба *Alternaria sonchi* S-102 - патогена осота полевого: дис. канд. биол. наук: 03.02.12 / Далинова А.А. – Санкт-Петербург, 2017. - 163 с.
35. Патент № 2066347 С1 (RU). Способ получения токсина микромицета *Alternaria solani* // Анненков Б.Г.; опубли. 10.09.1996.
36. Meena, M. *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis / M. Meena, S.K. Gupta, P. Swapnil et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. - 1451. - P.1-14.
37. Hasan, M. Bioherbicides: an eco-friendly tool for sustainable weed management / M. Hasan, M.S. Ahmad-Hamdani, A.M. Rosli, H. Hamdan H // *Plants*. – 2021. – Vol.10. - N6. - 1212. - P.1-14. <https://doi.org/10.3390/plants10061212>
38. Hasan, M. Weed control efficacy and crop-weed selectivity of a new bioherbicide WeedLock /M. Hasan, A.S. Mokhtar, A.M. Rosli, et al. // *Agronomy*. – 2021. – Vol.11. - N8. - 1488. - P.1-21. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081488>
39. De Souza Barros, V.M. Herbicides of biological origin: a review / V.M. De Souza Barros VM, J.L.F. Pedrosa D.R. Gonçalves, et al // *J Hortic Sci Biotechn*. – 2021. – Vol. 96. - N3. - P.288-296. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1846465>
40. Chaïb, S. Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research /S. Chaïb, J.C.A. Pistevos, C. Bertrand, I. Bonnard // *Algal Res*. – 2021. – Vol.54. - P.102-213. doi: 10.1016/j.algal.2021.102213
41. Kalra, R. Lichen allelopathy: a new hope for limiting chemical herbicide and pesticide use/ R.Kalra, X.A.Conlan, M. Goel, et al. // *Biocontrol Sci Technol*. – 2021. – Vol.31. - N8. - P.773-796. doi:10.1080/09583157.2021.1901071
42. Palanivel, H. Allelochemicals as natural herbicides for sustainable agriculture to promote a cleaner environment / H. Palanivel, G. Tilaye, S.K. Belliathan et al. In: Aravind, J., Kamaraj M., Prashanthi Devi M., Rajakumar S. (ed). *Strategies and tools*

for pollutant mitigation. Springer Cham. – 2021. – P. 93-116.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-63575-6_5

43. Берестецкий, А.О. Перспективы разработки новых гербицидов на основе природных соединений / А.О.Берестецкий // Вестник защиты растений. –2023. – Т.106. - N1. - С. 5-25.

44. Watson, A.K. Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide / Eds. N.E. Korres, N.R. Burgos, S.O. Duke. Boca Raton: CRC Press, 2019. - 664 p.

45. Berestetskiy, A. Sokornova S. Biological Approaches for Controlling Weeds / Ed. R. Radhakrishnan. London: IntechOpen, 2018. – 463 p.

46. Zhou, B. An evaluation of tenuazonic acid, a potential biobased herbicide in cotton / B. Zhou, H. Wang, B. Meng, et al. // Pest Manag Sci. - 2019. - Vol. 75, N9. - P. 2482–2489. <https://doi.org/10.1002/ps.5402>.

47. Патент США № 4915726 (US Patent 4915726). Production of tentoxin / Strobel G.A., Robeson D. J.; опублик. 10.04 1990 году.

48. Lawrie, J. Factors Influencing the Efficacy of the Potential Microbial Herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Amaranthus retroflexus* (L.) / J. Lawrie, V.M. Down, M.P. Greaves // Biocontrol Science and Technology. - 2000. – V. 10(1). – P. 81-87.

49. Sanodiya, B.S. Isolation and characterization of tenuazonic acid produced by *Alternaria alternata*, a potential bioherbicidal agent for control of *Lantana camara* / B.S.Sanodiya, G.S.Thakur, R.K. Baghel et al. // Journal of Plant Protection Research. – 2010. - Vol. 50.- N2. – P. 133-139.

50. Wang, H. Structurebased ligand design and discovery of novel tenuazonic acid derivatives with high herbicidal activity /H. Wang, Q. Yao, Y. Guo Y, et al. // J Adv Res. - 2022. - Vol. 40. - P. 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.001>

51. Wang, L. Engineered biosynthesis of thaxtomin phytotoxins/ L. Wang, M. Wang, Y. Fu, et al. // Crit Rev Biotech. - 2020. - Vol. 40. - N8. - P. 1–9. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1807461>
52. Wang, H. Fluorine-containing agrochemicals in the last decade and approaches for fluorine incorporation / H. Wang, H. Song, Q. Wang, et al. // Chin Chem Lett. - 2022. - Vol. 33, N2. - P. 626–642. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.07.064>
53. Wang, Y. Drug chemical space as a guide for new herbicide development: a cheminformatic analysis // J Agric Food Chem. - 2022. - Vol. 70, N31. - P. 9625– 9636. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01425>
54. Патент США № 5256628 (US Patent 5,256,628). Fungy of the genera *Alternaria* as products of biological / Abbas H.K., Vesonder F., Boyette C.D., Peterson S.W.; опублик. 26.11.1993 году.
55. Duke, S.O Unintended Effects of the Intended Herbicides on Transgenic Herbicide-Resistant Crops / S.O. Duke, L.B. Carvalho // Agronomy. - 2025. - Vol. 15.- N11. - P. 244-248. <https://doi.org/10.3390/agronomy15112448>
56. Патент РФ. 2019. № 2701957. Штамм гриба *Alternaria sonchi* Г-52 ВИЗР, обладающий гербицидной активностью против осота полевого (*Sonchus arvensis* L.) / Ганибал Ф.Б.; опублик. 02.10.2019.
57. Vijay, H.M. Fungal allergens / H.M. Vijay, V.P. Kurup // Clin Allergy Immunol.- 2004. - Vol.18. - P. 223-249.
58. Берестецкий, А.О. Перспективные подходы к поиску метаболитов грибов для борьбы с вредными членистоногими / А.О. Берестецкий, Г.Р. Леднев, Ц. Ху // Вестник защиты растений. - 2021. - Т. 4, N1. - С. 6-27.
59. Крюков, В.Ю. Физиолого-экологические аспекты взаимоотношений между энтомопатогенными грибами (Ascomycota, Нуроскреалес) и насекомыми / В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, В.В. Глупов // Паразитология - 2020. - Т. 54, вып. 6. - С. 443-469.

60. Салимова, Д.Р. Выделение и характеристика вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* с энтомотоксичными свойствами, 2024. – 136 с.
61. Берестецкий, А.О. Инсектицидная, акарицидная и цитотоксическая активность экстрактов некоторых грибов филлосферы и почвенных гипокрейнных микромицетов / А.О. Берестецкий, В.В. Инюшева, М.О. Петрова и др. // Микология и фитопатология. - 2019. - Т. 53. - № 1. - С. 17–25.
62. Патент США № № 20090257984. Fungy of the genera *Alternaria* as products of biological / Solfrizzo M., Vitti C., De Girolamo A., Visconti A.; опубл. 16.11.2009.
63. Kalyanasundaram, K. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated and identified from salt marsh plant in Vellar Estuary / K. Kalyanasundaram, N. Jeyarajpandian, M. Suyambulingam // Journal of Microbiology and Antimicrobials.- 2015. - Vol. 7. - N2. - P. 13–20.
64. Wang, J. Identification and Bioactivity of Compounds from the Mangrove Endophytic Fungus *Alternaria* sp. / J. Wang, W. Ding, R. Wang // Mar. Drugs. - 2015. - Vol. 13. - P. 4492-4504.
65. Srinivasan, R.P. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated in some medicinal plant species / R.P. Srinivasan, A. Nigam, J. Aruna J., et.al. // International Journal of Advanced Research in IT and Engineering. - 2015. - Vol.4. -N1. - P. 1-24
66. Carneiro, D.C. A patent review of the antimicrobial applications of lectins: Perspectives on therapy of infectious diseases / D.C. Carneiro, G.F. Luzimar, J.P. Monteiro-Cunha, et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Т. 132. – №. 2. – С. 841-854.
67. Gao, H. Fupyrone A and B, two new α -pyrones from an endophytic fungus, *Fusarium* sp. F20/ H. Gao, G. Li, X.P. Peng , H.X.Lou // Nat Prod Res. - 2020. -Vol. 34. - N3. - P. 335-340. doi: 10.1080/14786419.2018.1531405

68. Шамрайчук, И.Л. Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия / И.Л. Шамрайчук // Вестник Моск.ун-та. - 2020. - сер.16. - Т.75, N3. - С. 123-130.
69. Будынков, Н.И. Мониторинг альтернативных грибов на зерне озимой пшеницы в хозяйствах юга России (2014-2020) / Н.И. Будынков, С.Н. Михалев // Агрохимия. - 2022. - N2. - С. 76-82.
70. Nayab, D. Production of Glucoamylase from Novel Strain of *Alternaria alternata* under Solid State Fermentation / D. Nayab, S. Akhtar, N. Bangash, W. Nisa, et al. //Hindawi Bio, Med Research International. – 2022. - V. 16. - P. 1-9.
71. Melo, F.S. Effect of temperature in amylase and amyloglucosidase produced from english potato residue via fermentation in solid state / F.S. Melo, I.D. C. Alves, T.C.V. Barbosa, et al. //AGRIS International System for agricultural science and technology.- 2019. - P. 244-248.
72. García-Calvo, L. Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox / L. García-Calvo, R.V. Ullán, M. Fernández-Aguado, et al. // Journal of Proteomics. - 2018. - Vol.177. - P. 48-64.
73. Абдрахманова, А.Б. Характеристика ферментативной активности и патогенности видов *Alternaria* поражающих томаты / А.Б. Абдрахманова, Д.А. Есимсеитова, Г.К. Дюссембекова и др. // Наука и образование. - 2025. - [Т. 3. - N80.](#) - С. 84-97. doi: <https://doi.org/10.52578/2305-9397-2025-3-3-84-97>
74. Bi, Y-L. Response Mechanism of Extracellular Polymeric Substances Synthesized by *Alternaria* sp. on Drought Stress in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) / Y-L. Bi, H. Tan, H. Zhang, S-S. Kang, et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2024. - Vol.12. - N6.- P. 10-29. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c04009>
75. Rezazadeh, H. Enhancement of paclitaxel production by *Neopestalotiopsis vitis* via optimization of growth conditions / H. Rezazadeh, F. Ghanati, M. Bonfill, et al. // PLOS ONE. - 2024. - Vol.19. - N10. - P. 1- 14.

76. Govindjee, G. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond / G. Govindjee // *Journal of Plant Physiology*. - 2021. - Vol.266. - 153531. - P. 1-21. doi: 10.1016/J.JPLPH.2021.153531.
77. Brook, S. Lectins as versatile tools to explore cellular glycosylation / S. Brook // *European Journal of histochemistry*. - 2024. - Vol.66. - P. 3959-3962. doi:10.4081/eja.2024.
78. Rodrigues, S. Anti-inflammatory and anti-necrotic effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in experimental acute pancreatitis / S. Rodrigues, B. Damasceno, O. Alvaro, et al. // *Glycoconjugate Journal*. - 2022. - Vol.39. - N5. - P. 48-59. doi: 10.1007/s10719-022-10048-w
79. Sharma, S. Investigations on the Biological Activity of *Allium sativum* Agglutinin (ASA) Isolated from Garlic// *Protein Pept Lett*. - 2022. - Vol.29. -N 6. - P. 555-566.
80. García-Carnero, L.C. Virulence Factors of *Sporothrix schenckii* / L.C. García-Carnero, J.A. Martínez-Álvarez JA. // *J Fungi (Basel)*. - 2022. - Vol.8. - N3. - P. 318-332.
81. Mazur-Marzec, H. Antiviral Cyanometabolites-A Review / H. Mazur-Marzec, M. Cegłowska, R. Konkel, K. Pyrc // *Biomolecules*.- 2021. - Vol.11. - N3. - P. 474-489. doi: 10.3390/biom11030474.
82. Lagarda, D. I. Legume lectins: proteins with diverse applications / D.I. Lagarda, M.A.Guzman-Partida., M.L.Vazquez // *Int J Mol Sci*. - 2017. - Vol.18. - N6. - 1242. - P. 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
83. Xu, B. Fungal Biotechnology and Applications / B.Xu // *J Fungi (Basel)*. - 2023. - Vol.9. - N9. - P. 871-879. doi: 10.3390/jof9090871.
84. Bolt, H.M. Ricin: an ancient toxicant, but still an evergreen / H.M. Bolt, J.G. Hengstler // *Arch Toxicol*. - 2023. - Vol. 97.- N4. - P. 909-911. doi: 10.1007/s00204-023-03472-w.

85. Visser, M. Unexpected *Amanita phalloides*-Induced Hematotoxicity-Results from a Retrospective Study/M. Visser, W.F.J. Hof, A.M. Broek, et al. // *Toxins*(Basel). - 2024. - Vol.16. - N2. - P. 67-73. doi: 10.3390/toxins16020067
86. Naithani, S. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond / S. Naithani, S.S. Komath, A. Nonomura, G .Govindjee // *J Plant Physiol.* - 2021. - Vol.266. - 153531. - P. 1-20. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153531.
87. Barhouchi, B. Functionalized glucose-binding lectin from *Globularia alypum*: extraction, partial purification and biological activities / B. Barhouchi, F. Merouane, R. Amrani, K. Chidai // *Journal of Research in Pharmacy.* - 2026. - Vol.30. - N1. - P. 330-340. doi: 10.12991/jrespharm.1845185
88. Martínez-Álvarez, J.A. Analysis of some immunogenic properties of the recombinant *Sporothrix schenckii* Gp70 expressed in *Escherichia coli* / J.A. Martínez-Álvarez, L.C. García-Carnero, P.H. Kubitschek-Barreira et al. // *Future Microbiol.*-2019. - Vol.14. - P. 397-410. doi: 10.2217/fmb-2018-0295.
89. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Mol Biol Evol.* - 2021. - Vol.38. - N7. - P. 3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.
90. Van Damme, E.J.M. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine / E.J.M. Van Damme // *Glycoconjugate J.* - 2022. - Vol. 39. - P. 83–97. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x> .
91. Barbosa, F.E.V. Exploring structural characteristics and biological effects of the lectin from *Diclea Violacea* Mart.Ex. Benth: an integrative review / F.E.V. Barbosa, Y.deA. Granjeiro, R.R.Roma et al. // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2025. - Vol.321. - N3. - 146466. - P. 1-16.
92. Singh, R.M. Current trends lectins of microfungi / R.M Singh, R. Brahi, H.P. Kaur // *Critical reviews in biotechnology.* – 2016. –Vol.36.- P. 195-204.

93. Sahoo, J. P. Unraveling the complexities of plant cell wall biosynthesis for enhanced biofuel production: a molecular genetics perspective / J.P. Sahoo, et al. // Academia Molecular Biology and Genomics. Academia Journals. - 2025. - Vol.1. - N1. -7476. - P. 1-16. doi: 10.20935/AcadMolBioGen7476.
94. Martínez-Álvarez, J. A. Non-canonical virulence-associated proteins from pathogenic fungi: a review/ J. A. Martínez-Álvarez, et al. // Academia Molecular Biology and Genomics. Academia Journals. - 2025. - Vol. 2. - N1. - 7517. - P. 1-12. doi: 10.20935/AcadMolBioGen7517.
95. El-Maradny, Y.A. Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses / Y.A. El-Maradny, E.M. El-Fakharany, M.M. Abu-Serie, et al. //Int J Biol Macromol. - 2021. - Vol.179. - P. 239-258. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.015.
96. Mohammed, F. Lectins as bioactive molecules: emerging applications and therapeutic insights- A Review /F. Mohammed, R. Shaikh, A. S. Uzgare //International Journal of Chemistry Research. - 2026. - Vol.10. - P. 12-18. doi: 10.22159/ijcr.2026v10i1.304
97. Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-binding proteins in biotechnology and medicine / N. Sharon, H. Lis. - Kluwer Academic Publishers, 2007. - 404 p.
98. Slifkin, M. Lectins and their application to clinical microbiology / M. Slifkin, J. Doyle // Clin. Microbiol. Rev. – 1990. – V. 3.- N 3.- P. 197–218.
99. Drickamer, K. Evolving views of protein glycosylation / K. Drickamer, M.E. Taylor // Trends Biochem. Sci. – 1998. – V. 23.- № 9. – P. 321–324.
100. Singh, R.S. Structural aspects and biomedical applications of microfungus lectins/ R. S. Singh , A. K. Walia , J. F .Kennedy // Int J Biol Macromol. - 2019. - Vol.1. - N134. - P. 1097-1107. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.093.
101. Singh, R.S. *Purification and characterization of a heterodimeric mycelial lectin from *Penicillium proteolyticum* with potent mitogenic activity/* R.S. Singh, A.K. Walia

- J.F. Kennedy // Int J Biol Macromol.- 2019. - Vol.128. - P. 124-131. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.103.
102. Singh, R.S. Purification and characterization of a xylose-specific mitogenic lectin from *Fusarium sambucinum* / R.S. Singh, R.T.Shivani, J.F.Kennedy// Int J Biol Macromolecules. - 2020. - Vol.152. - P. 393-402.
103. Narasimhappagari, J. An L-fucose specific lectin from *Aspergillus niger* isolated from mycotic keratitis patient and its interaction with human pancreatic adenocarcinoma PANC-1 cells/ Narasimhappagari J., Shivakumar B., Prajna H., et al. //International Journal of Biological Macromolecules. - 2019. - Vol.134. - N2. - P. 487-497. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.192
104. Houser, J. Structural insights into *Aspergillus fumigatus* lectin specificity: AFL binding sites are functionally non-equivalent/J. Houser, J. Komarek, G. Cioci, et al. // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. - 2015. - Vol.71. - N3. - P. 442-453. doi: 10.1107/S1399004714026595.
105. Singh, R.S. Screening of *Aspergillus* species for occurrence of lectin activity and their characterization / R.S. Singh, A.K. Tiwary, R. Bhari // J. Basic Microbiol. - 2008. - Vol. 48. - P. 112-117.
106. Hegde, P. *Rhizoctonia bataticola* lectin induces apoptosis and inhibits metastasis in ovarian cancer cells by interacting with CA 125 antigen differentially expressed on ovarian cells / P.Hegde, S. Ballal , B.M.Swamy, et al. // Glycoconj J. - 2021. - Vol. 38.- N6. - P. 669-688. doi: 10.1007/s10719-021-10027-7.
107. Zeng, M. Identification and characterization of L-type lectin receptor-like kinases involved in Glycine max-*Phytophthora sojae* interaction / M. Zeng, B. Wan, L. Wang, et al. // Planta. - 2021. - Vol.254. - N6. - P. 128-136. doi: 10.1007/s00425-021-03789-9.
108. Мухаммадиев, Рин.С. Углеводная специфичность поверхностных лектинов грибов *Fusarium solani* / Рин.С. Мухаммадиев, Риш.С.Мухаммадиев, Т.В.Багаева // Вестник биотехнологии. - 2017. - Т.12. - №3. - С. 26-30.

109. Kobayashi, M. A jacalin-like lectin domain-containing protein of *Sclerospora graminicola* acts as an apoplastic virulence effector in plant-oomycete interactions / M. Kobayashi, H. Utsushi, K. Fujisaki, et al. // *Mol Plant Pathol.* - 2022. - Vol.23. - N6. - P. 845-854. doi: 10.1111/mpp.13197.
110. Gallegos, B. Lectins in human pathogenic fungi / B. Gallegos, R. Martinez, L. Perez, M. Del Socorro Pina, E. Perez, P. Hernandez // *Rev. Iberoam. Micol.* - 2014. - Vol. 31.- № 1. - P. 72-75.
111. Ismaya, W.T. Lectins from the Edible Mushroom *Agaricus bisporus* and Their Therapeutic Potentials / W.T. Ismaya, R.R. Tjandrawinata, H. Rachmawati // *Molecules.* - 2020. - Vol.25. - N10. - 2368. - P. 1-16. doi: 10.3390/molecules25102368
112. Singh, A. Mushrooms as Nutritional Powerhouses: A Review of Their Bioactive Compounds, Health Benefits, and Value-Added Products / A. Singh, R.K. Saini, A. Kumar, et al. // *Foods.* - 2025. - Vol.14. - N5. - P. 1-23. doi: 10.3390/foods14050741.
113. Sabotic, J. Fungal lectins show differential antiproliferative activity against cancer cell lines / J.Sabotič, A. Puerta, A. González-Bakker, et al. // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2025. - Vol.294. - 139220. - P. 1-12.
114. Chen, R. Pattern recognition receptors: function, regulation and therapeutic potential / R.Chen, J. Zou, J.Chen, et al. // *Signal Transduct Target Ther.* - 2025. - Vol.10. - N1. - P. 216-302. doi: 10.1038/s41392-025-02264-1
115. Montag, N. The emerging role of GlycoRNAs in immune regulation and recognition / N. Montag, P. Gousis, J. Wittmann // *Immunol Lett.* - 2025. - Vol.276. - 107048. - P. 1-13. doi: 10.1016/j.imlet.2025.107048.
116. Rabinovich, G.A. Glycan-Binding Proteins in Immunity / G.A. Rabinovich, C. Rademacher, M. Schattner, M.S. Macauley//*Annu Rev Immunol.* - 2026. - Vol.44. - N1. - P. 267-294. doi: 10.1146/annurev-immunol-083024-030822.
117. Varrot, A., et al. Structural insights into fungal lectin-carbohydrate interactions / A.Varrot, et al. // *Glycobiology.* - 2020. - Vol.32. - N3. - P. 234–248.

118. Bleuler-Martinez, S. Structure-function relationship of a novel fucoside-binding fruiting body lectin from *Coprinopsis cinerea* exhibiting nematotoxic activity / S. Bleuler-Martinez, A. Varrot, V. Olieric, et al. // *Glycobiology*. - 2022. - Vol.32. - N7. - P. 600-615. doi: 10.1093/glycob/cwac020
119. Мухаммадиев, Р. С. Сравнительная характеристика лектинов сапрофитных и фитопатогенных штаммов грибов *Fusarium solani*: дис. канд. биол. наук:03.02.03 / Мухаммадиев Р.С. - Казань, 2018. – 148 с.
120. Silva, J.F. Lectin Purification through Affinity Chromatography Exploiting Macroporous Monolithic / J.F. Silva, C.M. Gonçalves, L.D.L. Silva, et al. // *Adsorbents*. - 2023. - Vol.10. - N1. - P. 36-53. doi:10.3390/separations10010036
121. Muhammadiev, R.S. Lectin micromycetes genus *Fusarium* and the dynamics of their formation / R.S. Muhammadiev, T.V. Bagaeva // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2015. - Vol.6. - N6. - P. 1769-1775.
122. Ulzurrun, V.D.G. Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin / V.D.G. Ulzurrun, Y.P. Hsueh // *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2018. - Vol.102. - N9. - P. 3939-3949. doi: 10.1007/s00253-018-8897-5.
123. Петрова, Н.В. Современное состояние лектинологии растений / Н.В. Петрова, А.Р. Агьямова, Н.Е. Мокшина, Т.А. Горшкова // *Физиология растений*. - 2024. - Vol.71. - N2. - P. 115-134.
124. Moreno-Ruiz, D. Stress-Activated Protein Kinase Signalling Regulates Mycoparasitic Hyphal-Hyphal Interactions in *Trichoderma atroviride* / D. Moreno-Ruiz, L. Salzmann, M.D. Fricker, et al. // *J Fungi (Basel)*. - 2021. - Vol.7. - N5. - P. 365-372. doi: 10.3390/jof7050365. PMID: 34066643; PMCID: PMC8148604
125. Abas, A. Impact of Some Hafr Al-Batin Ligno-cellulosic Natural Resources: Characterization, Evaluation and Enzymes Production / A. Abas, A.E. Aty // *Acta fytotechnica et zootechnica*. - 2024. - Vol.27. - N3. - P. 222-233. doi:10.15414/afz.2024.27.03.222-233.

126. Dutta, P. Molecular interaction between plants and *Trichoderma* species against soil-borne plant pathogens / P. Dutta, M. Mahanta, S.B. Singh, et al. // *Front Plant Sci.* - 2023. - Vol.15. - N14. - P. 1-28. doi: 10.3389/fpls.2023.1145715.
127. Gringhuis, S.I. C-Type Lectin Receptors in Host Defense / S.I. Gringhuis, T.B.H. Geijtenbeek // *Annu Rev Immunol.* - 2026. - Vol.44. - N1. - P. 149-180. doi: 10.1146/annurev-immunol-083024-035049.
128. Faivre, J. A Multifunctional Antioxidant Lectin at the Crossroads of Microbiota Regulation, Inflammation, and Cancer / J. Faivre, H. Shalhoub, T.S. Nguyen, et al. // *Cancers (Basel).* - 2025. - Vol.17. - N14. - 2395. - P. 1-12. doi: 10.3390/cancers17142395.
129. Mellema, R.A. Layilin at the crossroads of immunity and motility: a C-type lectin receptor in Hyaluronan Signaling/ R.A. Mellema, A.C. Petrey // *Glycobiology.* - 2025. - Vol.35. - N11. - 1125. - P. 1-12. doi: 10.1093/glycob/cwaf071.
130. Морозова, О.В. Ростовые и антагонистические свойства мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* / О.В. Морозова, М.Е.Ноорделоос, Б. Дима, и др. // *Современная микология в России. Материалы международного микологического форума.* - М.: Национальная академия микологии, 2024. –Т.10.- 350с.
131. Bleuler-Martinez, S. Structure-function relationship of a novel fucoside-binding fruiting body lectin from *Coprinopsis cinerea* exhibiting nematotoxic activity / S. Bleuler-Martinez, A. Varrot, V.Olieric, et al. // *Glycobiology.* - 2022. - Vol.32. - N7. -P. 600-615. doi: 10.1093/glycob/cwac020.
132. Chavonet, E. Search for host defense markers uncovers an apple agglutination factor corresponding with fire blight resistance / E. Chavonet, M. Gaucher, R. Warneys, et al. // *Plant Physiol.* - 2022. - Vol. 188. - N2. - P. 1350-1368. doi: 10.1093/plphys/kiab542.
133. Carcea, M. Wheat Germ Agglutinin (WGA): Its Nature, Biological Role, Significance in Human Nutrition, and Possibility to Be Used as Marker of Whole-Grain

- Status in Wheat-Based Foods / M. Carcea, S. Melloni, V. Narducci, V. Turfani // *Foods*. - 2024. - Vol.13. - N18. - 2990. - P. 1-18. doi: 10.3390/foods13182990.
134. Guevara, R.B. Succinylated Wheat Germ Agglutinin Colocalizes with the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Glycoprotein CST1 / R.B. Guevara, B.A. Fox, D.J. Bzik, et al. // *Sphere*. - 2020. - Vol.5. - N2. - e00031-20. - P. 1-22. doi: 10.1128/mSphere.00031-20.
135. Jiang, Y. Antimicrobial peptides: An important link in the game theory between plants and pathogens / Y. Jiang, J. Du, M.Z. Latif, Y. Yue // *Journal of Advanced Research*. - 2025. - Vol. 82. - P. 113-125. doi:10.1016/j.jare.2025.06.085
136. Martz, F. Stinging Nettle (*Urtica dioica*) Roots: The Power Underground-A Review / F. Martz, S. Kankaanpää // *Plants*. - 2025. - Vol.14. - N2. - P. 279-398. doi:10.3390/plants14020279
137. Bhusal, K.K. Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review / K.K. Bhusal, S.K. Magar, R. Thapa, et al. // *Heliyon*. - 2022. - Vol.8. - N6. - e09717. - P. 1-14. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09717.
138. Chen, C.S. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities / C.S. Chen, C.Y. Chen, D.M. Ravinath, et al. // *Plant Biol*. - 2018. - Vol.18. - N 1. - P. 3-14. doi: 10.1186/s12870-017-1222-0.
139. Alam, K. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites / K. Alam, A. Mazumder, S. Sikdar, et al. // *Front Microbiol*. - 2022. - Vol.13. - P. 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2022.968053.
140. Chikalovets, I. Activity Dependence of a Novel Lectin Family on Structure and Carbohydrate-Binding Properties / I. Chikalovets, A. Filshtein, V. Molchanova, et al. // *Molecules*. - 2019. - Vol.25. - N1. - P. 150-162. doi: 10.3390/molecules25010150.
141. Xu, L. Exploratory review on the effect of *Astragalus mongholicus* on signaling pathways / L.I. Xu, X. Yu, Q. Chen // *Front Pharmacol*. - 2024. - Vol. 15. - 1510307.- P. 1-11. doi: 10.3389/fphar.2024.1510307.

142. Li, C. MoCDC14 is important for septation during conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* / C. Li, S. Cao, C Zhang, et al. // Mol Plant Pathol. - 2018. - Vol.19. - N2. - P. 328-340. doi: 10.1111/mpp.12523.
143. Senta, G. Antifungal Effect of *Bauhinia variegata* Lectin (BvL) on *Bipolaris oryzae* / D.O.D. Senta, G. Cardoso, A. Neis, et al. // Current Microbiology. - 2024. - Vol.81. - N10. - P. 329-338.
144. El-Araby, M.M. Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds / M.M. El-Araby, E.H. El-Shatoury, M.M. Soliman, et al. // AMB Expr. - 2020. - Vol.10. - P. 90-104. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01024-4>
145. Sabotic, J. CNL-Clitocybe nebularis Lectin-The Fungal GalNAc β 1-4GlcNAc-Binding Lectin / J. Sabotič, J. Kos // Molecules. - 2019. - Vol.24. - N23. - P. 4204-4209. doi: 10.3390/molecules24234204.
146. Loera-Rubalcava, J. A mytilectin from *Mytilus californianus*: Study of its unique galactoside interactions, oligomerization patterns, and antifungal activity / J. Loera-Rubalcava, E. García-Maldonado, A. Rodríguez-Romero //International Journal of Biological Macromolecules. - 2025. - Vol.308. - N1. - 142338.-P.1-20. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.142338.
147. Sharma, S. Antimicrobial Studies on Garlic Lectin /S. Sharma, K. Raj, M. Riyaz, D.D. Singh // Probiotics Antimicrob Proteins. - 2023. - Vol.15. - N6. - P. 1501-1512. doi: 10.1007/s12602-022-10001-1.
148. Silva, S.L. Cratylia mollis lectin reduces inflammatory burden induced by multidrug-resistant Staphylococcus aureus in diabetic wounds / S.L.Silva, S.J. Santos Castelo Branco, S.J., I.S.S. Silva, et al. // Histochem Cell Biol. - 2025. - Vol.163. - P. 13-29. <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02330-9>.
149. El-Maradny, YA, Biochemical characterization of a novel purified lectin extracted from *Pleurotus ostreatus* mushroom for its antiviral activity / Y.A. El-

- Maradny, M.M. Abu-Serie, M.H. Hashish M.H., et al. // Sci Rep. - 2025. -Vol.15. - 1. - P. 278-293. doi: 10.1038/s41598-025-09967-z.
150. Coelho, B.B. Lectin as antimicrobial agent / B.B.Coelho, P.M.S. Silva, V.F. Oliveira, et al. // J. Applied Microbiol. - 2018. - Vol.125. - P. 1238-1252.
151. Janez, N. Exposure to specific fungal lectins during adhesion impairs biofilm formation of *Listeria* on polystyrene / N.Janež, M. Ladányi, M. Sterniša, et al. // Microb Biotechnol. - 2024. -Vol.17.-N12.-e70040.-P.1-13. doi: 10.1111/1751-7915.70040.
152. Jug, B. Modulation of *Campylobacter jejuni* adhesion to biotic model surfaces by fungal lectins and protease inhibitors /B. Jug , P.M. Šikić, M. Sterniša, et al. // Front Cell Infect Microbiol.- 2024.-Vol.22.-N14.-P.1-10. doi: 10.3389/fcimb.2024.1391758.
153. Klonjkowski, B. Legume Lectins with Different Specificities as Potential Glycan Probes for Pathogenic Enveloped Viruses /B. Klonjkowski // Cells.-2022.-Vol.11.-P.339-363. doi: 10.3390/CELLS11030339.
154. Gupta, A. Mannose-specific plant and microbial lectins as antiviral agents: A review / A. Gupta, K. Yadav, A. Yadav, et al. //Glycoconjugate Journal.-2024.-Vol.41.-N1.-P.1-33.
155. Sharma, A. Role of ribosome-inactivating proteins: From toxins to therapeutics / A. Sharma, S. Gupta, N.R. Sharma, K. Paul // IUBMB Life.-2023.-Vol.75.-N2.-P.82-96. doi: 10.1002/iub.2675.
156. Bakac, E.R. Lectin paradoksuna guncel bir bakis acisi /E. R. Bakac, C.B. Oney //Atlas Universitesi Tip ve Saglik Bilimleri Dergisi., 2026.-109p. doi:10.54270/atljm.2026.109
157. Gupta, A. Status of mannose-binding lectin (MBL) and complement system in COVID-19 patients and therapeutic applications of antiviral plant MBLs/ A. Gupta, G.S. Gupta //Mol Cell Biochem.-2021.-Vol.476.-N8.-P. 2917-2942. doi: 10.1007/s11010-021-04107-3.

158. Sabotic, J. Fungal lectins show differential antiproliferative activity against cancer cell lines /J. Sabotič, A. Puerta, A. González-Bakker, et al. // Int J Biol Macromol.- 2025.- Vol.294.-139220.-P.1-21. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139220.
159. Zhou, R.W. Safe immunosuppression-resistant pan-cancer immunotherapeutics by velcro-like density-dependent targeting of tumor-associated carbohydrate antigens/ R.W. Zhou, P.K.Purohit, J.H.Kim, et al. // Cell.-2025.-Vol.188-P.6737-6753. doi: 10.1016/j.cell.2025.09.001
160. Subramanian, V. From the bench to the reactor: engineered filamentous fungi for biochemical and biomaterial production / V.Subramanian, M.J.Adler, M.Benyamin, et al //Biotechnol Biofuels Bioprod. -2025 .-Vol.18.-N1.-P.113-125. doi: 10.1186/s13068-025-02712-8.
161. Chilakamarry, C.R. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: opportunities and challenges / C. R. Chilakamarry, A. M. M.Sakinah, A. W. Zularisam, et al. // Bioresource Technology.- 2022.- Vol. 343.- P.22-34.
162. Tang, X. Application and Analysis of *Rhizopus oryzae* Mycelia Extending Characteristic in Solid-state Fermentation for Producing Glucoamylase /X.Tang, T. Luo, X. Li, et al. // J Microbiol Biotechnol.-2018.-Vol.28.-N11-P. 1865-1875. doi: 10.4014/jmb.1805.05023.
163. Еременко, В.В. О процессе жидкофазного глубинного культивирования микроорганизмов /В.В.Еременко, П.П. Кормилец, З.Н.Власенко, А.П. Руденко //Химия растительного сырья.-2008.-№4.-С.185-186.
164. Rezazadeh, H. Optimization of the fermentation media, mathematical modeling, and enhancement of paclitaxel production by *Alternaria alternata* after elicitation with pectin / H. Rezazadeh, F. Ghanati, M. Bonfill, et al. //Scientific Reports .- 2024.- Vol.14.-12980.-P.1-16.
165. Abdel-Fatah, S. S. Production, bioprocess optimization and γ -irradiation of *Penicillium polonicum*, as a new Taxol producing endophyte from *Ginkgo biloba* /S.S.

- Abdel-Fatah, A.I. El-Batal ,G.M. El-Sherbiny, et al. // *Biotechnol. Reports.* -2021.- Vol.30.-e00623.-P.1-12.
166. Ismaiel, A. A. Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima* /A.A. Ismaiel, A.S. Ahmed, I.A. Hassan, et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* -2017.- Vol. 101.- P.5831–5846.
167. El-Bialy, H. A. Elicitors stimulate paclitaxel production by endophytic fungi isolated from ecologically altered *Taxus baccata* /H.A. El-Bialy, H. S. El-Bastawisy // *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*-2020.-Vol. 13.-P. 79–87.
168. Николаева С. Влияние состава питательной среды на рост грибов рода *Alternaria* /С.Николаева, А.Николаев, В. Шубина Л.Волощук // *Revista Universitii de Stat din Moldova.*- 2011.- Т.1.-№41.-С.117-123.
169. Son, S.Y. Comprehensive Secondary Metabolite Profiling Toward Delineating the Solid and Submerged-State Fermentation of *Aspergillus oryzae* KCCM 12698 /S. Y. Son , S. Lee , D. Singh, et al.// *Front Microbiol.*- 2018 .-Vol.9.-1076.-P.1-12. doi: 10.3389/fmicb.2018.01076.
170. Берестецкий, А.О. Характеристика евразийских изолятов по морфолого-культуральным, молекулярным и физиолого-биохимическим признакам /А.О. Берестецкий, В.М. Терлецкий В.М. и др. // *Микология и фитопатология.* – 2013. – Т. 47. – N 2. – С. 120-128.
171. Далинова, А.А. Особенности начального развития *Alternaria sonchi* Davis in vitro и на листьях различных растений /А.А.Далинова, А.О.Берестецкий // *Микология и фитопатология.*- 2014.- Т.48.- № 4.- С. 274-280.
172. Салимова, Д.Р. Идентификация и токсикологическая характеристика штаммов *Alternaria japonica* / Д. Р. Салимова, Д. С. Кочура, С. В. Сокорнова и др. // *Микология и фитопатология.* - 2021. - Т.55. -№ 3. - С. 203-218.
173. Nadig, N. Conserved copper regulation of the antimicrobial isocyanide brassicicolin A in *Alternaria brassicicola* /N. Nadig ,S. C. Park ,J. W. Bok ,N. P.

- Keller// Fungal Genet Biol . -2023.- Vol.169.-103839.-P.1-5. doi: 10.1016/j.fgb.2023.103839.
174. Vaquera, S. Influence of environmental parameters on mycotoxin production by *Alternaria arborescens*/ S.Vaquera, A. Patriarca, V.F.Pinto // International Journal of Food Microbiology. - 2016. - V.219. - P. 44-49.
175. Pedras, M.S. Metabolite diversity in the plant pathogen *Alternaria brassicicola*: factors affecting production of brassicicolin A, depudecin, phomapyrone A and other metabolites / M.S.Pedras, M.R.Park // Mycologia.-2015-. Vol.107.-N6.- P. 113-118.
176. Sukamto,S Optimisation of α -Amylase and Amyloglucosidase Enzyme Concentration on Glucose Syrup Characteristics from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L var. Antin 2) /S. Sukamto, O.T.Cahya S.Sudiyona, R.Suprihana //EJFOOD 2025.-Vol.7.-N1.-P.8-12.
177. Li, M. Modified Fusicoccane-Type Diterpenoides from *Alternaria brassicicola* / F. Li, S. Lin, S.Zhang, et al. //J Nat Prod.-2020,-Vol.83.-N6.-P.1931-1938.
178. El-Hady, N.A. Bioprocessing of camptothecin rom *Alternaria brassicicola*, an endophyte of *Catharanthus roseus*, with a strong antiproliferative activity and inhibition to Topoisomerases. /N.A. El-Hady, A.I. ElSayed, R.M.Wadan et al.//Microb Cell Fact. - 2024.-Vol.23.-N1.-P.214-226. doi: 10.1186/s12934-024-02471-5.
179. Takahashi, J.A. A Close View of the Production of Bioactive Fungal Metabolites Mediated by Chromatin Modifiers /J. A. Takahashi, L. L. de Queiroz,D. M.Vidal // Molecules. -2024.- Vol.29.-N15.-3536.-P.1-18. doi: 10.3390/molecules29153536.
180. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И Нетрусов // М: Академия. - 2005. - 608 с.
181. Ильинская, О.Н. Краткосрочные тест-системы для определения генотоксичности / О.Н. Ильинская, А.Б. Маргулис // Методическое руководство. - Казань: КГУ. - 2005.-31с.
182. Габитов, Р.А. Выявление и идентификация скрытой инфекции картофеля / Р.А.Габитов, Р.Т. Мухаметгина, Э.А. Кабрера Фуентес, Т.В. Багаева // Ученые

записки Казанского университета. Естественные науки. - 2012. - Т.154. - N2. - С. 97-102.

183. Ганибалл, Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*: Методическое пособие / Ф.Б. Ганибалл. - Санкт-Петербург: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. – 72 с.

184. Raja, H.A. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community /H.A. Raja, A.N. Miller, C.J. Pearce, N.H. Oberlies //J.Nat.Prod.-2017.-Vol.80.-P.765-770.

185. Луцик, М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик // Львов: Высшая школа, 1981. - 156 с.

186. Bhari, R. Lectin activity in mycelial extracts of *Fusarium* species/ R. Bhari, B. Kaur, R.S. Singh // Brazilian Journal of microbiology.-2016.-Vol.47.-N3.-P.527-780. doi:10.1016/j.bjm.2016.04.024.

187. Singh, R. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle / R. Singh, L. Nawale, D. Sarkar, C.G. Suresh // PLoS ONE. - 2016. - Vol. 11.- N 1. - P. 1-18.

188. Сова, В.В. Выделение и очистка белков: Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков / В.В. Сова, М.И. Кусайкин. - Владивосток: Дальневост. ун-т, 2006. - 42 с.

189. Nikitina, N.V. Effect of *Azospirilla* lectin on germination capacity of seeds / V.E. Nikitina, N.V. Bogomolova, E.G. Ponomareva, O.I. Sokolov //Biology bulletin. -2004. -Vol. 31.- N4.- P.431-435.

190. Павловская, Н.Е. Пероксидазозависимый иммунитет гороха к фузариозу/ Н.Е.Павловская, И.Н.Гагарина, И.В.Горькова и др. // Вестник Орел ГАУ.-2010.- N5.- С.72-75.

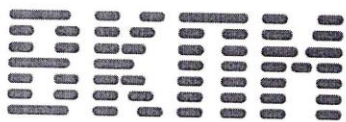
191. Maron, D.M. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // Mut. Res. – 1983. – V.113. – P.173-215.

192. Mortelmans, K. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay / K. Mortelmans, E. Zeiger. // *Mutat.* – 2000.- V. 445. – P.29-60.
193. Фонштейн Л.М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем / Л.М. Фонштейн, С.К. Абилов, Е.В. Бобринев.- М.: Высшая школа. - 1985. – 34с.
194. Al-Saman, M. A. Bioactivity of lectin from Egyptian *Jatropha curcas* seeds and its potentiality as antifungal agent Global / M. A. Al-Saman, S. A. Farfour, A. A. Tayel, N. M. Rizk // *Advanced Research Journals.* - 2015. - Vol. 4.- N7. - P. 987-997.
195. Семак, И.В. Биохимия белков: Методическое пособие по спец. практикуму для студентов биологического факультета / И.В. Семак, Т.Н. Зырянова, О.И. Губич. - Минск: БГУ. - 2007. - 52 с.
196. Биссвангер Х. Практическая энзимология: пер с англ / Х. Биссвангер. - Москва: Бином. Лабораторных знаний, 2010. – 328 с. https://rusneb.ru/catalog/000199_000009_004745535/
197. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, CLSI document M100-S24. - 2014. - Vol. 34.- № 1. – P. 282-299.
198. Шпаков, А.С. Методические основы полевых опытов с кормовыми культурами / А. С. Шпаков, Ю. К. Новоселов, Г. Д. Харьков, и др. – Москва : ФГБОУ ДПО РАКО АПК, 2024. – 332 с.
199. Зинуров, М.Р. Синтез лектинов микромицетами рода *Alternaria* / М.Р.Зинуров, Е.Е.Зинурова, Ш.З. Валидов, М.Д. Фролов, М.А. Сысоева, Т.В. Багаева // *Вестник Балтийского университета им. И. Канта. Серия: естественные науки.* - 2026. - №2. - С. 108-119. <https://doi.org/10.5922/vestniknat-2026-2-7>.
200. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич.-СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2008. - 352 с.

201. Singh, R.S. Optimization of culture conditions, partial purification and characterization of a new lectin from *Aspergillus nidulans* // R.S. Singh, R. Bhari, A.K. Tiwary // Roum. Biotechnol. Lett. - 2010. - Vol. 15, № 1. - P. 4990-4999.
202. Зинуров, М.Р. Кинетика роста и образования лектинов грибами рода *Alternaria* в зависимости от времени культивирования и компонентов питательной среды / М.Р. Зинуров, Т.В. Багаева, Е.Е. Зинурова, М.А. Сысоева // Технологии живых систем. -2025. - Т.22. -№3. - С.5-17. <https://doi.org/10.18127/j20700997-202503-01>.
203. Ха, Т.З. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilagnosus* на питательной среде с мелассой / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова Е.Н. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.- 2020.-Т.10. -N4.- С.708-718.
204. Khan, F. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity / F. Khan, A. Ahmad, M.I. Khan // Arch. Biochem. Biophys. - 2007. - Vol. 457.- N2. - P. 243-251.
205. Мухаммадиев, Р. С. Выделение, очистка и характеристика лектина *Fusarium solani* 4 / Рин. С. Мухаммадиев, Риш.С. Мухаммадиев, Е.В. Скворцов, и др. // Прикладная биохимия и микробиология.- 2021.- Т.57.- №2.- С.145-151. doi: 10.31857/S0555109921020094.
206. Аленькина, С. А. Стимулирующий эффект лектинов ассоциированных бактерий рода *Azospirillum* на всхожесть и морфологические характеристики проростков яровой пшеницы при смоделированных абиотических стрессах / С.А. Аленькина, В.Е. Никитина В. Е // Физиология растений.- 2021.- Т.68.- №2.- С.170-176. doi: 10.31857/S0015330321010024
207. Багаева, Т. В. Стимулирующее действие лектинов микромицетов рода *Alternaria* на семена и проростки пшеницы / Т.В. Багаева, М.Р. Зинуров, Е.Е. Зинурова // Успехи современного естествознания.-2026.-№2.-С.15-20. <https://doi.org/10.17513/use.38474>.

208. Зинуров, М.Р. Увеличение кормовой базы для животноводства при использовании лектинов микромицетов / М.Р. Зинуров, М.А. Сысоева, Е.Е. Зинурова, Н.Б. Фельдман, Т.В. Багаева // Бутлеровские сообщения.- 2026.- Т.86.- №4.- С.115-121. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-115>.
209. Патент № 2 373 763 РФ. Средство для предпосевной обработки семян гороха / Павловская, Н.Е., Гагарина И.Н., Роговин В.В. и др.; публ.20.11.2009
210. Патент №2386 252 РФ. Средство для повышения системной индуцированной устойчивости кормовых культур, например гороха, к грибковым патогенам /Шалимова О.А., Лещуков К.А. , Штахова Т.А.;опубл. 20.04.2010.
211. Прищепов, Ф.А. Проектирование предприятий биотехнологии: Учебное пособие / Ф.А. Прищепов. – Уфа: УГНТУ, 2018. –174 с.
212. Крылов, И.А. Основы проектирования биотехнологических производств. Нормативная база. Общие принципы построения технологических схем: Учебное пособие / И.А. Крылов, А.А. Кухаренко, В.И. Панфилов. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2003. – 168 с.
213. Аникина, И.Н. Проектирование предприятий сельскохозяйственных биотехнологических производств: учебное пособие / И.Н. Аникина, Д.Д. Сейтжанова, Н.Н. Кайниденов. – Павлодар: Кереку, 2017. – 139 с.
214. Нормы технологического проектирования предприятий дрожжевой промышленности 1.20.11.001-04. – Москва. – 2004.-131с.
215. Антипов, С. Т. Инновационное развитие техники пищевых технологий: Учебное пособие / С.Т. Антипов, А.В. Журавлев, Д.А. Казарцев, А.Г. Мордасов и др. – СПб.: Лань, 2016. – 660 с.
216. Мухаммадиев, Р.С. Физико-химические свойства лектина микромицета *Rhizoctonia solani* / Р.С.Мухаммадиев, А.Н.Ибрагимов, Т.В.Багаева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им.Ю.А. Овчинникова. - 2016. - Т.12. - N4. - С. 15-21.

217. Zinurov, M.R. Physicochemical properties of micromycetes *Alternaria alternate* 4 lectin /M.R. Zinurov, E.E. Zinurova, T.V. Bagaeva, M.A. Sysoeva //GSC Advanced Research and Reviews. - 2025. – Vol. 23. - N3. - P. 1-6.
<https://doi.org/10.30574/gscarr.2025.23.3.0168>
218. Иванищев, В.В. Засоление почвы и его влияние на растения / В.В. Иванищев, Т.Н. Евграфкина, О.И. Бойкова, Н.Н. Жуков //Известия Тульского государственного университета. Науки о земле. - 2020. - N3. - С.28-42.
219. Зинуров, М.Р. Исследование антимикробных свойств лектинов микромицетов рода *Alternaria* / М.Р. Зинуров, Т.В. Багаева, Е.Е. Зинурова // Сборник тезисов конгресса с международным участием «Эпидемиология – 2025». - Москва.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2025. – С. 216-218.



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

2039

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Alternaria alternata 4

Дата депонирования: 03 февраля 2026 года

Депозитор: Зинурова Елена Евгеньевна

Продукт, синтезируемый штаммом (область применения штамма):

продуцент лектинов

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: F-2039

Руководитель БРЦ ВКПМ
Проф.

Синеокий С.П.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института пищевых производств
и биотехнологии
А.С. Сироткин
« 05 » 2026 г.



ПРЕПАРАТ «БАРЬЕР» – РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ И ФУНГИЦИДНОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ (ПРОЕКТ)
ТУ 20.20.13.211-001-02069639-2026

дата введения 18.03.2026

Руководитель разработки:
д.х.н., профессор
Сироткин М.А. Сысоева

Исполнитель:
Зинуров М.Р. Зинуров

Казань, 2026 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по УР «КНИТУ»,

профессор, д.э.н.

Султанова Д.Ш.

06» 06 2026 г.

Акт

О внедрении результатов кандидатской диссертационной работы
Зинурова М.Р.

Комиссия в составе председателя – директора института пищевых производств и биотехнологии, д.т.н., профессора Сироткина А.С. и членов: и.о. зав. каф. ПищБТ, д.т.н., доцента Китаевской С.В.; доц. каф. ПищБТ, к.х.н. Сысоева Е.В. составили настоящий акт о том, что результаты кандидатской диссертации Зинурова М.Р. «Биотехнология получения высокоактивных лектинов *Alternaria alternata* и создание на их основе препарата для растениеводства» используются в учебном процессе, проводимом на кафедре пищевой биотехнологии.

Материалы, изложенные в диссертационной работе Зинурова М.Р. используются в лабораторных занятиях:

- магистрантов по дисциплине «Безопасность продуктов биотехнологии», обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология».

Председатель комиссии:

Директор ИПБТ, д.т.н.

А.С. Сироткин

Члены комиссии:

и.о. зав. каф. ПищБТ, д.т.н., доцент

доц. каф. ПищБТ, к.х.н.

С.В. Китаевская

Е.В. Сысоева