

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВА ВИКОРИСТАННЯ ПРОТЕЇНОВО-ВІТАМІННОГО ГРИБНОГО ПРЕПАРАТУ В ТВАРИННИЦТВІ

С. М. Супрун, Г. В. Донченко, Ю. М. Пархоменко, Л. І. Чехівська, Т. М. Кучмеровська

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Розроблена біотехнологія одержання протеїново-вітамінного препарату на основі сумісного культивування штамів *Fusarium sambucinum* F-100011 і *Mycelium sterilius* F-100014. Препарат характеризується високим вмістом вітамінів, протеїну (до 54 %) та інших біологічно активних речовин. До складу препарату входять незамінні амінокислоти, ненасичені жирні кислоти, хітин, який є компонентом грибної клітини. Проведено дослідження дії біопрепарату на дубовому шовкопряді, ікрі і молоді коропа, перепелах, лабораторних мишах. В усіх випадках встановлена позитивна дія препарату. Результати проведених досліджень вказують на можливість використання препарату для розведення і вирощування тварин з метою підвищення їх життєздатності і продуктивності.

Ключові слова: МІКРОМІЦЕТИ, ПРОТЕЇН, ВІТАМІНИ, КОРМОВА ДОМІШКА, БІОТЕХНОЛОГІЯ, МИШІ, ДУБОВИЙ ШОВКОПРЯД, РИБИ

Біомаса грибів є джерелом природних форм біологічно активних речовин: незамінних амінокислот, ненасичених жирних кислот, вітамінів, вітаміноподібних речовин, таких як убіхінон Q₁₀, що мають властивості антиоксидантів і антимуtagenів. За вмістом амінокислот грибний протеїн не поступається тваринному, що дає змогу використовувати його для отримання харчових і кормових домішок. Відомо, що клітинна стінка грибів містить хітин та глюкани, які є природними сорбентами та підвищують цінність грибної біомаси. Мікроміцети ще з давніх часів вживались у їжу людей у Китаї, Японії, їх використовували для ферментації рису, соєвих культур. Гриби не вибагливі до субстрату для їх культивування та стійкі до екологічних змін, технологічні. Мікроскопічні гриби є перспективними для використання їх в різних галузях — захисті навколишнього середовища, сільському господарстві, медицині [1–3]. З використанням мікроміцетів розроблені нові біотехнології отримання ліпідів, харчових волокон на основі хітин-глюканового комплексу, фармакологічних препаратів, біологічно активних домішок харчового і кормового призначення [4, 5]. В Україні біотехнології отримання протеїнових та вітамінних домішок на основі мікробного синтезу розвинуті слабо. На основі мікробіологічного синтезу з використанням гриба-продуцента *Blakeslea trispora* одержують кристалічний бета-каротин, на Трипільському біохімічному заводі отримують кормовий препарат «Ліпрот» з переважним вмістом лізину.

Метою роботи була розробка біотехнології одержання протеїново-вітамінного препарату грибного походження та вивчення його біологічної дії на тварин.

Матеріали і методи

Для отримання протеїново-вітамінного препарату шляхом сумісного культивування підібрані наступні штами грибів: *Fusarium sambucinum* F-10011 — продуцент комплексу вітамінів, зокрема, тіаміну, пантотенової і нікотинової кислот та їх похідних, а також штам

Mycelia sterilia-F-10014 — продуцент протеїну, амінокислот. Штами депоновані і зберігаються в колекції культур Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Мікроміцети вирощували на синтетичному живильному середовищі Чапека з мелясою (1 % по р. в.) в якості джерела вуглецю. Посівний матеріал (інокулят) вирощували в колбах Єрленмейєра на качалках при 240 об./хв протягом 24 годин. Ферментацію проводили при глибокому культивуванні в колбах або в виробничих умовах на лабораторній стендовій установці Науково-технічного центру виробничої біотехнології ОАО «Стиролбіотех». Середовище для ферментації стерилізували в автоклаві за 1–1,5 атм. протягом 30 хв та засівали 5 % інокулятом. Культивування в лабораторних умовах проводили протягом 62 годин, а в виробничих — 42–48 годин. Отримано дві форми препарату — порошкоподібну і рідку. Рідку форму препарату отримували за розробленою технологією з використанням термічної обробки. Вміст біологічно активних речовин у грибах і в препараті визначали з використанням методів, наведених в довідниках з мікології [6], убіхінон Q₁₀ — спектрофотометрично з попереднім хромографічним розділенням компонентів неомілованих речовин [7]; вміст хітину в біомасі визначали за різницею кількості N-ацетилглюкозаміна після гідролізу хлоридною кислотою, перерахунок кількості глюкозаміну на хітин проводили з використанням коефіцієнта 1,17 [3].

Вітамінно-коферментний препарат був протестований на дубовому шовкопряді (I), рибах (II), перепелах (III) та білих мишах (IV).

У серії дослідів I використовували гусениць дубового шовкопряду *Antheraea pernyi* G.–M., які були оброблені препаратом у розведенні (1:20). Для контрольної групи гусениць корм обробляли водою.

У серії дослідів II випробування препарату проводили на однорічному коропі *Ciprinus carpio* L. Ікру коропа (0,5 кг), отриману від однієї самки, обробляли рідиною формою грибного препарату, розведеного водою (1:1), який додавали в об'ємі, рівному об'єму ікри, за 1 хв до закінчення запліднення. У контрольної групи в процесі інкубації застосовувалась профілактична антисапролегніозна обробка фіолетовим «К» (у досліді обробка хімічними препаратами не проводилась). Піддослідні риби було розділено на 5 груп: 1 — контроль (без обробки препаратом), 2 — внутрішньочеревне введення препарату (0,3 мл на особу); 3 введення *per os* у формі 3 % розчину крохмалю в біопрепараті з рахунку 0,4 мл на особу; 4 — коропа витримували в 0,5 % розчині хлориду натрію (гіперосмотична інфільтрація), потім протягом 5 хвилин — у розведеній водою (1:10) рідкій формі препарату; 5 — протягом 3 діб витримували у розчині грибного препарату (1:100). Риби 1–5 груп тричі (з тижневим інтервалом) обробляли біопрепаратом. Риб усіх п'яти груп утримували в аерированій воді при $t=16-18^{\circ}\text{C}$ і через день годували стандартним комбікормом. Підрахунок результатів проводили через два тижні після останньої обробки риб. Враховували рибоводно-біологічні показники (маса, довжина, висота, товщина тіла), кількість ектопаразитів, також визначали ряд імунологічних показників: рівень природних антитіл, титр комплементу, вміст протеїну в сироватці крові. Для визначення титру комплементу використовували сенсibilізовані еритроцити вівці [8]. Активність лізоцима визначали на агарі за допомогою ліофілізованих мікрококів [9].

У серії III використовували дві групи перепелів — контрольну і дослідну по 90 птахів кожна (45 самців та 45 самок). У комбікорм дослідної групи вводили препарат, який дозволяв підвищити рівень протеїну в комбікормі на 1,5 %. Дослід тривав 28 діб, препарат починали вводити з 14 доби.

У серії IV біотестування препарату проводили на трьох групах мишей по 7 особин у кожній у двох дослідях. Тривалість експериментів становила 21 добу. Всі тварини утримувались на стандартному раціоні віварію, тварини дослідної групи отримували біопрепарат із розрахунку 0,36 г/особину в першому досліді і 1,8 г/особину — в другому досліді. Контролем були миші, які отримували лише стандартний раціон віварію. Для оцінки

впливу біопрепарату було використано такі критерії: поведінка тварин, вживання корму та води, показники периферичної крові (кількість лейкоцитів, еритроцитів, лейкоцитарна формула, згортання крові) і біохімічні показники: рівень протеїну в сироватці крові і окремих її фракціях, активність холінестерази у сироватці крові, вміст аміаку в тканині мозку, а також морфологічне дослідження внутрішніх органів. Визначення вищевказаних показників проводили за загальновизнаними методами.

Всі експерименти було виконано згідно з Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин, затвердженим Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Результати й обговорення

Отримання препарату. Проведені раніше дослідження фізіолого-біохімічних особливостей селекційованих штамів, здатності їх до синтезу та накопичення окремих вітамінів, швидкості росту та відсутності антагонізму надали можливість підібрати штами та умови сумісного культивування, з метою отримання кормової протеїново-вітамінної домішки. Так, були відібрані наступні культури для сумісного культивування: *Fusarium sambucinum* IMB F-10011 — продуцент водорозчинних вітамінів, зокрема нікотинової кислоти і її біологічно активних похідних, незамінних амінокислот (зокрема, лізину та триптофану) та культура *Mycelia sterilia* як продуцент протеїну. Відпрацьовано умови їх сумісного культивування і згідно з регламентом на стендовій установці Науково-технічного центру промислової біотехнології ОАО «Стиролбіотех» м. Обухів були нароблені партії препарату. За рахунок сумісного культивування скорочується термін ферментації до 46 годин, у 2–3 рази підвищується вміст досліджуваних вітамінів та протеїну в кінцевому препараті (рис. 1).

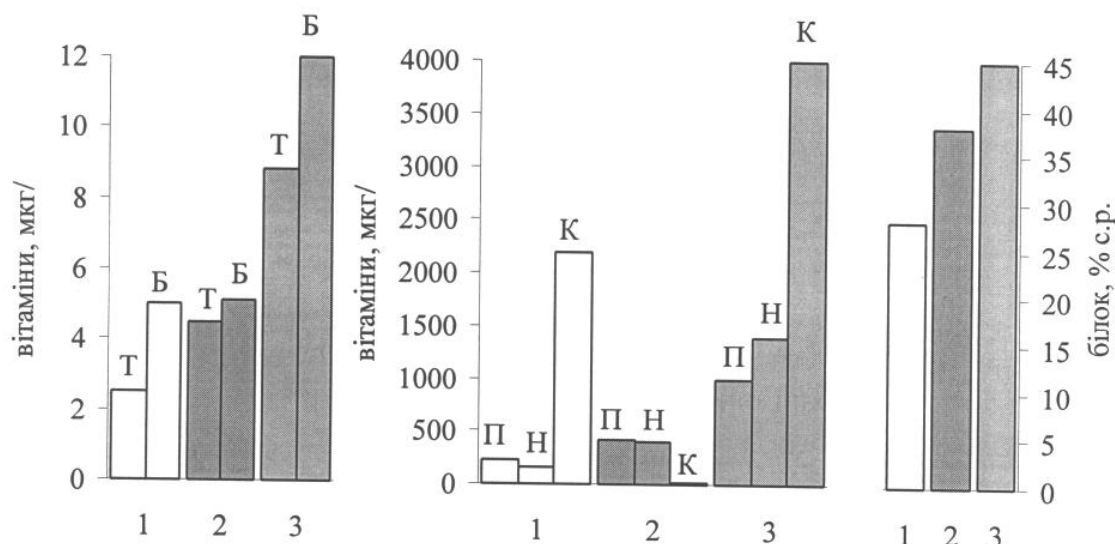


Рис. 1. Вміст вітамінів при моно- та сумісному культивуванні штамів-продуцентів.
1 — *Penicillium sclerotiorum*; 2 — *Fusarium sambucinum*; 3 — сумісне культивування; Т — тіамін; Б — біотин;
П — пантотенова кислота; Н — нікотинова кислота; К — каротиноїди

Розроблена технологія передбачає отримання різних форм грибного препарату (порошкоподібної та рідинної форми). Вітамінно-протеїновий препарат являє собою комплекс природних біологічно активних речовин з високим вмістом протеїну (52,0–54,0 %), ліпідів (4,4–4,6 %), вітамінів (у мкг/г): тіаміну (В₁) — 25,0–30,0; пантотенової кислоти (В₅) — 1250,0–1400,0; нікотинової кислоти (РР) — 800,0–1200,0, біотину (В_н) — 18,0–20,5; убіхінону (Q₁₀) — 28,0–32,0; каротиноїдів — 9700–12000; НАД — 450–600; вітаміну Е — 38,0–40,0; хітину — 7,2–7,8 %, а також містить есенціальні жирні кислоти й мікроелементи. Рідинна форма препарату може бути отримана при спеціальній термічній обробці. Вміст біологічно активних речовин у рідинній формі препарату приведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика рідинної форми препарату, отриманого на основі штамів *F. sambucinum* і *M. sterilia*

Показник	Кількість
Тіамін, мкг/л	20–30
Кислота пантотенова, мкг/л	2500–3500
Кислота нікотинова, мкг/л	4500–5200
НАД, мкг/л	4200
Убіхінон Q ₁₀ , мкг/л	30
Суміш незамінних амінокислот, мкг/л	25,0–30,0
Кислоти жирні	олеїнова, ліноленова и арахідонова
Мікроелементи	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺

Препарат у рідинній формі був випробуваний у дослідах на шовкопряді та ікри коропа, у порошкоподібній — на перепелах і лабораторних мишах.

Випробування на дубовому шовкопряді. Використання вітамінно-протеїнового препарату для обробки гусениць шовкопряда значно стимулювало продуктивність дубового шовкопряда і забезпечувало збільшення маси коконів на 8–12 % у самок і на 6–9 % — у самців. Одночасно спостерігали підвищення маси шовкової оболонки кокона на 23–31 % у самок і 37–40 % — у самців. Використання препарату також дозволяє захистити корисних комах від інвазійних інфекцій, таких як мікроспоріоз та ядерний поліедроз, захворювання на які знизилось на 10 та 11 %, відповідно.

Випробування на коропі. Обробка ікри коропа рідинним біопрепаратом суттєво підвищила вихід личинок із ікри. У дослідній партії цей показник становив майже 100 %, в той час, як у контрольній партії ікри він не перевищував 74 %. Спостереження свідчить, що обробка ікри біопрепаратом сприяла підвищенню стійкості мальків до дії несприятливих факторів навколишнього середовища (рис. 2).

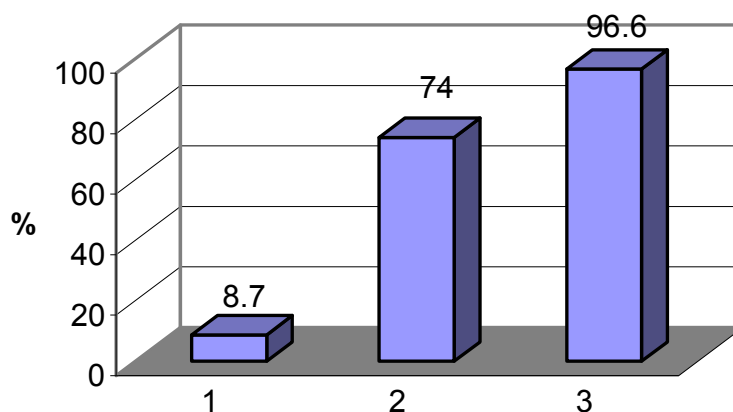


Рис. 2. Дія препарату на виживання ікри і вихід мальків коропа
1 — контроль (без обробки); 2 — контроль 2 (стандартний метод обробки); 3 — обробка препаратом

Витримування коропів у розчині препарату позитивно впливало на їх масові та лінійні характеристики (табл. 2).

Таблиця 2

Рибоводно-біологічна характеристика однорічних коропів, оброблених біопрепаратом, ($M \pm m$, $n=20$)

Показник	Групи (метод обробки)				
	1 (контроль)	2	3	4	5
Маса тіла, г	19,7 \pm 1,54	20,73 \pm 1,16	20,60 \pm 0,92	22,26 \pm 1,20	23,19 \pm 1,18
Довжина, см	9,76 \pm 0,15	9,99 \pm 0,15	9,97 \pm 0,14	10,25 \pm 0,16	10,17 \pm 0,14
Висота, мм	28,39 \pm 0,68	30,00 \pm 0,51	29,88 \pm 0,42	30,58 \pm 0,47	30,72 \pm 0,55
Товщина, мм	14,49 \pm 0,36	14,59 \pm 0,27	14,86 \pm 0,23	15,67 \pm 0,31	15,45 \pm 0,31
Коефіцієнт вгодованості по Фультону	2,06 \pm 0,03	2,01 \pm 0,02	2,03 \pm 0,02	1,99 \pm 0,02	2,15 \pm 0,02

Примітка: 1 — без обробки; 2 — внутрішньочеревне введення препарату; 3 — введення препарату *per os*; 4 — гіперосмотична обробка перед додаванням препарату; 5 — витримування у розчині препарату,

Оцінюючи результати імунологічного і паразитологічного аналізу в цілому, можна констатувати, що обробка риб біопрепаратом позитивно впливає на них. Під дією препарату титр комплементу знижувався. Зокрема, зниження рівня комплементу свідчить про активацію системи неспецифічного імунітету. Титр природних антитіл у сироватці крові риб піддослідних груп, в основному коливався в незначних межах. Додавання препарату після гіперосмотичної обробки проявляло протекторну дію і суттєво знижувало звичайний рівень інфікованості дактилогірусами (табл. 3).

Таблиця 3

Імунологічна і паразитологічна характеристика сеголеток коропа, оброблених біопрепаратом, ($M \pm m$, $n=15$)

Показник	Групи (метод обробки)				
	1 (контроль)	2	3	4	5
Титр природних антитіл ($n=24-48$)	3,38 \pm 0,28	3,42 \pm 0,23	3,40 \pm 0,24	3,46 \pm 0,22	3,12 \pm 0,25
Титр комплементу ($n=10-33$)	4,42 \pm 0,17	—	—	2,90 \pm 0,28*	2,91 \pm 0,20*
Вміст лізоцима, мкг/мг ($n=24-49$)	0,20 \pm 0,02*	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01*	0,21 \pm 0,24
Кількість протеїну, г% ($n=24-49$)	2,71 \pm 0,24	2,62 \pm 0,13	3,24 \pm 0,20*	3,12 \pm 0,20	2,80 \pm 0,24
Кількість дактилогірусів на зябрах, екз. ($n=15$)	4,07 \pm 0,98	5,80 \pm 0,72	6,88 \pm 1,29*	3,47 \pm 0,68	5,07 \pm 0,75

Примітка: позначення груп такі ж, як і в таблиці 1

Випробування препарату на перепелах та мишах. У дослідах із перепелами відзначено ріст маси молодняку починаючи з 21 доби, на початку 28 доби маса тіла дорівнювала 124,5, а в контролі — 116,6 г. Про позитивний вплив досліджуваного вітамінно-протеїнового препарату на організм вказують і показники активності сивороточної холінестерази.

В експерименті з мишами встановлено, що при введенні в корм біопрепарату загальний стан мишей був задовільним, корм вони поїдали повністю, потреба у споживанні води звичайна. Виживання тварин у піддослідних групах дорівнювало 100 % і було вищим, ніж у контрольній групі. Темпи приросту маси тіла не мали міжгрупових розбіжностей. Результати досліджень периферичної крові свідчать про те, що рівень гемоглобіну, кількість

еритроцитів і лейкоцитів у піддослідних мишей знаходились на рівні величин фізіологічних норм. При дослідженні лейкоцитарної формули встановлено превалювання лімфоцитів і сегментоядерних форм. Виявлено зниження палочкоядерних форм лейкоцитів і це можна розцінювати як позитивний фактор. Здатність крові до згортання зберігалась без змін.

Введення в експериментальні раціони мишей біопрепарату призводило до деякого зниження рівня альбумінів у піддослідних тварин порівняно до контрольних величин і підвищенню γ -глобулінової фракції сировоточних протеїнів. Про позитивний вплив досліджуваного вітамінно-протеїнового препарату на організм мишей свідчать і показники активності сировоточної холінестерази. Також відзначено зниження в 2,85 раза кількості аміаку в тканинах мозку мишей, які отримували препарат із розрахунку 1,8 г/особу та ідентичність рівнів цього метаболіту обміну азоту з контрольною групою у тканині мозку мишей у другому варіанті досліджу.

Висновки

1. Внаслідок сумісного культивування двох штамів грибів *Sambucinum* F-100011 і *Mycelium sterilius* F-100014 отримано протеїново-вітамінний препарат, який за вмістом біологічно активних речовин проявляє суттєві порівняно з препаратами, отриманими при монокультуванні тих же грибів.

2. Випробування препарату на різних видах тварин виявило його здатність суттєво підвищувати виживання тварин, їх стійкість до інвазійних та інфекційних захворювань, що сприяє підвищенню продуктивності відповідних тварин.

Перспективи подальших досліджень Проведення значно широкішого випробування препарату на теплокровних тваринах з метою підготовки його до впровадження у виробництво.

S. M. Suprun, G. V. Donchenko, J. M. Parkhomenko, L. I. Chehovskaya, T. M. Kuchmerovska

OBTAINING AND PROSPECT OF PROTEIN-VITAMIN FUNGIAL PREPARATION APPLICATION IN ANIMAL BREEDING

S u m m a r y

The preparation with high content of vitamins, aminoacid, coenzymes and other biologically active substances (coenzyme Q 10, chitin and its derivatives) was obtained by compatible cultivation of two strains micromycetes: *Fusarium sambucinum* IMV F-100011 and *Mycelia sterilia* IMV F-100014. The preparation was tested on oaken silkworm, carpol and young fish, mice, quails. Positive results were obtained under application of protein-vitamin preparation in all cases. The results prove effectiveness of the preparation as fodder premix for increasing of nutrition and biological value animals. Usage of the preparation also protects animals from infectious diseases and contributed to the survival.

C. M. Супрун, Г. В. Донченко, Ю. М. Пархоменко, Л. И. Чеховская, Т. М. Кучмеровская

ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕИНО-ВИТАМИННОГО ГРИБНОГО ПРЕПАРАТА В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

А н н о т а ц и я

На основе селекционированных штаммов — *Fusarium sambucinum* ИМВ F-100011 и *Mycelia sterilia* ИМВ F-100014 при их совместном культивировании был получен протеино-витаминный препарат с высоким содержанием витаминов, коферментов, убихинона Q₁₀ и

других биологически активных веществ, в том числе хитина и его производных. Препарат был протестирован на дубовом шелкопряде, икре и сеголетках карпа, перепелах, мышах. Во всех случаях препарат оказывал положительное действие. Применение препарата повышало не только производственные показатели животных, но также защищало их от инфекционных заболеваний и способствовало их выживаемости. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности использования препарата для разведения и выращивания животных с целью повышения их жизнеспособности и продуктивности.

1. *Wainwright M.* Novel use for fungi in biotechnology / M. Wainwright // *Chem. Ind.* — 1990. — № 2. — P. 131–134.
2. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture / Ch. Hobbs. — Santa Cruz : C. A., 1995. — 251 p.
3. *Феофилова Е. П.* Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования / Е. П. Феофилова, Д. В. Немцев, В. М. Терешина, В. П. Козлов // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1996. — Т. 32, № 5. — С. 483–492.
4. *Зуев Е. Т., Брагинцева Л. М., Воробьева Г. М., Неменуца Л. А.* Патент RU (РФ) 2259209. — заяв. 27.08.2005. Бюл. № 24
5. *Ковалев А. Л.* Энергетические аспекты использования биомассы в животноводческих фермах России / А. Л. Ковалев // *Российский химический журнал.* — 1997. — Т. 41, № 6. — С. 100–104.
6. Методы экспериментальной микологии / Ред. В. И.-К. Білай. — Наукова думка, 1982. — С. 261–268.
7. *Донченко Г. В.* Биохимия убихинона Q / Г. В. Донченко. — К. : Наук.думка, 1988. — 297 с.
8. *Козлов Л. В.* Иммунология / Л. В. Козлов, П. М. Вавилова, Г. В. Голосова. — 1985. — № 3. — С. 66–68.
9. *Лабинская А. С.* Микробиология с техникой микробных исследований / А. С. Лабинская. — М. : Медицина, 1978. — 178 с.

Рецензент: профессор, доктор ветеринарных наук Д. Ф. Гуфрій