

STEPANENKO A.I.¹, MORGUN B.V.¹, TROYANOVSKA A.V.², RYBALKO O.I.², VELYKOZHON L.G.³

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: alex.rybalka@mail.ru

³ Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

POLYPHENOL OXIDASE GENES *P.O-A1* AND *P.O-D1* VARIATION AMONG UKRAINIAN WINTER WHEAT (*T. AESTIVUM* L.) CULTIVARS

Aims. Polyphenol oxidase (P.O), a ubiquitous enzyme in plants, is associated with browning and discoloration of breeding products such as pan bread, steamed bread, pasta, foodstuff of freezing dough. There are five genes that control the P.O activity: *P.O-A1*, *P.O-D1*, *P.O-A2*, *P.O-B2* and *P.O-D2*. Genes *P.O-A1*, *P.O-D1* can occur in several allelic variants: alleles of high activity (*P.O-A1a* and *P.O-D1b*), alleles of low activity (*P.O-A1b* and *P.O-D1a*) which encode different types of P.O enzymes. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of P.O gene is molecular identification STS markers P.O33 and P.O29.

Results. Among the studied wheat by codominant and dominant molecular markers two varieties (Bilyava and Ednist) carrying low activity *P.O-A1*, *P.O-D1* alleles and 26 varieties containing one low activity allele *P.O-D1a* were identified. **Conclusions.** The results of the study can be used efficiently to identify genotypes with low P.O activity in wheat breeding.

Key words: *Triticum aestivum* L., *P.O* genes, molecular markers, marker-assisted selection.

УДК 579:577.6

СУПРУН С.М.¹, ДОНЧЕНКО Г.В.¹, ПАРХОМЕНКО Ю.М.¹, ХАРКЕВИЧ Е.С.², КУРЧЕНКО И.Н.², АРЕТИНСКАЯ Т.Б.³, СТЕПАНЕНКО С.П.¹, КРАВЧЕНКО О.А.³

¹ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины,

Украина, 01601, г. Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, ГСП Д 0368, г. Киев, ул. Заболотного, 154

³ Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Украина, 03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 15

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИНКСОДЕРЖАЩЕЙ ВИТАМИННО-ПРОТЕИНОВОЙ ДОБАВКИ

Микромицеты благодаря уникальным физиолого-биохимическим свойствам являются основными продуцентами в биотехнологии – используются для получения лекарственных препаратов в медицине, в сельском хозяйстве, рациональном природопользовании. На их основе была создана новая область медицины – фармацевтическая микология. Грибы содержат белок, сходный по аминокислотному составу с животным, богаты витаминами, коферментами, а также синтезируют биологически активные вещества, перспективные для профилактики и лечения целого ряда патологических состояний. На основе грибов различных таксонов могут быть получены ферменты, витамины, антибиотики, полисахариды и лекарственные

средства, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон, что является одним из оснований их использования в качестве кормовых добавок. Грибы технологичны: нетребовательны к субстрату, обладают довольно высокой скоростью роста. Однако они требуют для своего роста и накопления биомассы внесения в среду ряда микроэлементов, в частности цинка [1–4]. Испытание наномерных биогеенных металлов в сельском хозяйстве дало положительный результат. Благодаря использованию достижений современных технологий удалось

синтезировать нанокарбоксилаты пищевых кислот биогенных металлов [5, 6]. Совместное их использование с биологически активными веществами грибов изучено не было.

Цель исследований: получение цинксодержащей лечебно-профилактической добавки на основе селекционированных штаммов-продуцентов микроскопических грибов с целью применения в животноводстве.

Материалы и методы

В работе был использован метод поэтапной селекции микромицетов и получены штаммы – белково-витаминные продуценты: *Mycelia sterilia* (white) ИМВ F-100014, *Penicillium sclerotiorum* F-100015, *Fusarium sambucinum* F-139, *Fusarium sambucinum* ИМВ F-100011. Штаммы депонированы и хранятся в депозитории Украинской коллекции микроорганизмов (ИМВ НАН Украины).

Исследованные микромицеты выращивали на минеральной среде Чапека с мелассой (1 % по р.в.) в качестве единственного источника углерода и добавлением наноаквахелата цинка (1–2 г/л). Посевной материал (инокулят) готовили в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Культивирование проводили вышеуказанным способом 72 часа в колбах или в производственных условиях с использованием ферментера емкостью 1,2 м³ 28–30 часов (ПП БТУ – Центр, г. Ладыжин). Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5 %-ным инокулятом. Получено две формы препарата – порошкообразную и жидкую (с использованием термической обработки). В опытах с нанопрепаратом цинка добавляли 1–2 мл/л водного раствора наноаквахелата цинка в концентрации 3–5 г/л. Определение витаминов и других биологически активных веществ проводили с использованием стандартных методов [7, 8], аминокислоты – на аминокислотном анализаторе ААА–339 (Чехия). Содержание хитина в биомассе определяли по разнице количества N-ацетилглюкозамина после гидролиза 2 и 6 N соляной кислотой и производили перерасчет количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1.17 [9, 10].

Разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) растворяли в гексане и хроматографировали на хроматографе HRGC 5300 (Италия) на стеклянной набивной колонке 3,5 м, започне-

нной Chromosorb W/HP с нанесенной 10 % жидкой фазой Silar 5CP при программированной t^c 140–250°C, с нарастанием 2° мин. Идентификацию индивидуальных жирных кислот проводили с помощью стандартов фирмы «Sigma» и «Serva». Содержание индивидуальных жирных кислот выражали в процентах от общей суммы [11]. Опыты по доклиническому испытанию препарата проводили на насекомых, рыбах и перепелах. Корм гусениц дубового шелкопряда Полеский тасар обрабатывали жидкой формой препарата. В эксперименте с личинками карпа использовали группы по 20 особей, весом 300 мг каждая. Эксперимент по изучению стрессостойкости проводили при отсутствии аэрации и корма. В опытные группы особей, содержащихся в озерной воде, добавляли по 5 мл препарата с различной концентрацией цинка (2 и 3 мл/л), контролем служил препарат без цинка и вода. В опыте с перепелами (каждая по 20 особей) к основному рациону вносили добавку в количестве 2,0; 4,0; 6,0 г/особь; длительность эксперимента составляла 60 суток. В опытах на животных использовали методы биохимического и иммунологического анализа [12].

Результаты и обсуждение

Нами были исследованы физиолого-биохимические свойства полученных штаммов. Для получения витаминно – протеинового препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-100011 – продуцент витамина PP (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Fusarium sambucinum* F-139 – продуцент CoA и белка. Удельная скорость роста данных штаммов составляла 0,28–0,35 ч⁻¹.

Штаммы синтезировали комплекс незаменимых аминокислот. Так, у *F. sambucinum* F-100011 общая сумма аминокислот составляла 27,68 мг % биомассы, с преобладанием лизина, дейцина, аспарагиновой кислоты, а у *F. sambucinum* F – 139–25 мг % биомассы, с преобладанием глутаминовой и аспарагиновой кислот. У *F. sambucinum* F-100011 идентифицировано 26 жирных кислот, из насыщенных – пальмитиновая (до 14 %) и пальмитолеиновая, а из полиненасыщенных (76 %) жирных кислот – олеиновая (23,2 %), линолевая (46,2 %), линоленовая (6,95 %) и арахидоновая (2,0–6,0 %), являющиеся предшественниками простагландинов и входящие в состав структурных элементов мембран.

Цинксодержащая витаминно-протеиновая добавка представляет собой комплекс

природных биологически активных веществ (витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество никотиновой кислоты и ее производных, в частности NAD^+ (6,0 мг/г а.с.в.), CoA (2,0 мг/г а.с.в.), витаминов Е и В₁₂. Известно, что цинк входит в состав ферментов, активирующих восстановительные процессы в тканях. Таким образом, входящие в состав препарата вещества обуславливают его высокую биологическую активность, антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства.

Была проведена проверка действия препарата на иммунологические, паразитологические, биохимические показатели рыб, насекомых и перепелов. В эксперименте по обработке личинок рыб препаратом снижалось поражение сапролегниозом, значительно повышалась стойкость к заболеваниям по сравнению с контролем в условиях отсутствия аэрации и корма. (рис.). Титр природных антител в сыворотке рыб подопытных групп в основном изменялся в пределах 3,12–3,46. Под действием препарата титр комплемента

снижался до 2,90, тогда как у рыб контрольной группы он равнялся 4,42, что свидетельствует о возрастании неспецифического иммунитета. Введение препарата оказывало протекторное действие и заметно снижало обычный уровень зараженности паразитами.

Использование цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки сокращало средний период кормления гусениц, количество погибших особей снижалось на 18 % по сравнению с контролем. Выход качественных коконов увеличивался на 31 % (табл. 1). У гусениц дубового шелкопряда при применении препарата наблюдалось улучшение производственных показателей, снижение заболеваемости ядерным полиэдрозом.

При испытании добавки на перепелах отмечено стабильное увеличение прироста живой массы на 10,5 %, повышение бактерицидной (БАСК) и лизоцимной (ЛАСК) активности сыворотки крови (табл. 2). Содержание гемоглобина увеличивалось на 6,2 %, повышалась выживаемость особей, особенно молодых.

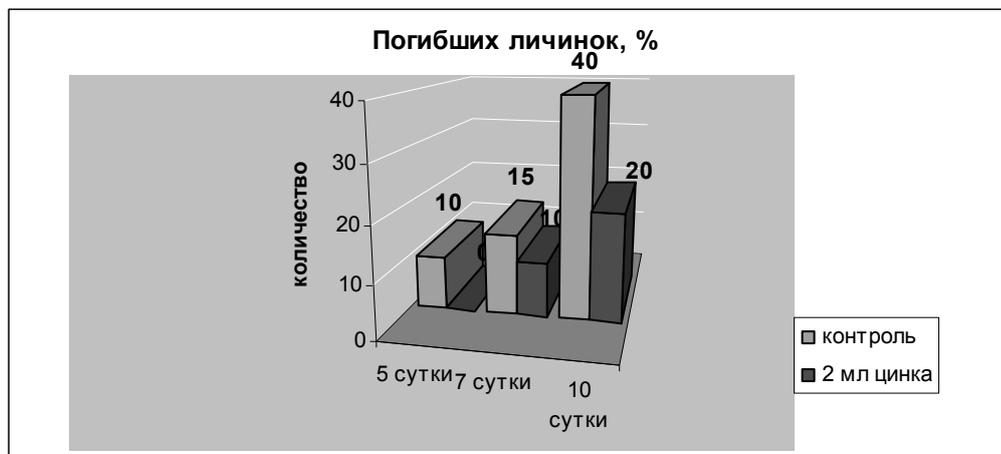


Рис. Влияние цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки на выживаемость личинок карпа

Таблица 1. Влияние цинксодержащего витаминно-протеинового препарата на биологические показатели дубового шелкопряда

Вариант	Средний период кормления гусениц, сутки	Погибших гусениц, %	Выход качественных коконов, %	Средняя масса, мг % к контролю			
				кокона		оболочки	
				самки	самцы	самки	самцы
Zn 2 мл/л	42,0 ± 0,48	0,5	96,0	7026	5006	618	564
Zn 3 мл/л	42,6 ± 0,50	0,7	95,2	6970	4992	608	558
препарат без Zn	46,1 ± 0,51	2,5	90,0	6687	4383	580	528
контроль (без обработки)	50,0 ± 0,80	18,5	65,0	6088	4600	458	462

Таблица 2. Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови перепелов после применения препарата через 60 суток ($M \pm m$, $n = 20$)

Показатели	Группы перепелов								
	Контроль	Опыт 1	%	Опыт 2	%	Опыт 3	%	Опыт 4	%
БАСК, %	12,60±0,28	13,05±0,33	3,5	14,50±0,41	15,0	13,60±0,58	7,9	13,35±0,42	5,9
ЛАСК, %	15,70±0,54	16,30±0,39	3,8	18,76±0,61	19,4	17,40±0,67	10,8	16,45±0,51	4,7

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокая биологическая ценность витаминно-протеиновой добавки определяется не только значительным содержанием витамином группы В (никотиновой, пантотеновой кислот), незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, но также использованием наноаквахелата цинка.

Результаты доклинического испытания

грибного препарата показали улучшение роста и развития животных, их выживаемости, улучшение биохимических и иммунологических характеристик, что позволяет прогнозировать эффективность использования цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки как лечебно-профилактического средства для повышения производительных показателей и природной резистентности сельскохозяйственных животных.

Литература

- Hobbs Ch. Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. Santa Cruz С.А., 1995. – 251 p.
- Беккер З.Е. Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 260 с.
- Скворцова М.М., Горшина Е.С., Макарова М.А., Качалай Д.П. Мипро-вит – грибной препарат иммуномодулирующего и антиоксидантного действия // I съезд микологов России. (Москва, март 2001 г.). – Тез. докл. – М.: Национальная Академия Микологии, 2002. – С. 256.
- Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П. Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // Прикл. биох. микробиол. – 1996. – 32, № 5. – С. 483–492.
- Копилевич В.А., Максін В.І., Каплуненко В.Г., Косинов М.В. Функциональные наноматериалы для потребностей сельского хозяйства // Вісник НАУ. – 2008. – № 130. – С. 349–354.
- Аретинська Т.Б., Трокоз В.О., Максін В.І., Каплуненко В.Г., Косинов М.В. Ефективність використання наноаквахелатів мікроелементів при вирощуванні дубового шовкопряда // Біологія тварин. – 2009. – 11, № 12. – С. 312–315.
- Экспериментальная витаминология, под ред. Островского Ю.М. – Минск: Наука и техника, 1979. – 546 с.
- Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 583 с.
- Johnson A.R. Improved method of hexosamine determination // Anal. Biochem. – 1971. – 44, N 2. – P. 628–635.
- Петрушко Г.М., Калужный М.Я. Хитин дрожжеподобных организмов рода *Candida* // Прикл. биох. микробиол. – 1971. – 7, № 6. – С. 637–642
- Байдалинова Л.С., Кривич В.С., Бахлодина Л.П. Методические рекомендации и указания по газовой хроматографии жирных кислот. – Калининград, 1977. – 33 с.
- Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.

SUPRUN S.M.¹, DONCHENKO G.V.¹, PARKHOMENKO J.M.¹, KHARKEVICH E.S.², KURCHENKO I.N.², ARETINSKAYA T.B.³, STEPANENKO S.P.¹, KRAVCHENKO E.B.³

¹ Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Ukraine, 01601, Kiev, Leontovycha str., 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

² D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, Kiev, Zabolotnogo str., 154

³ National University of life and environment science of Ukraine, Ukraine, Kiev, Heroiv oborony str., 15

MEDICINAL-PREVENTATION PROPERTIES OF VITAMIN-PROTEIN ZINC CONTAINING PRODUCT

Aims. Preparation of zinc containing vitamin and protein supplement based on the selection strains producers of vitamins, coenzymes and studying its effect on the performance and viability of animal productivity.

Methods Morphological, physiological and biochemical properties for selection strain mycelial fungi-producing protein, vitamins и other biologically active substances have been studied, using of known methods. Modern methods have been used to for preclinical animal trials. **Results.** Established the strains of *Fusarium sambucinum* F-10011F F-139 have a high growth rate of 0.28–0.34 hour⁻¹, rich in essential amino acids, unsaturated fatty acids such as oleic, linoleic, linolenic and arachidonic have been detected. Especially valuable presence in fungi arachidonic acid which is a precursor of prostaglandins in the body of animals and humans. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical properties was developed using joint cultivation of selected strains of *Fusarium sambucinum*. The preparation has high content of vitamins, unsaturated fatty acids and other biologically active substances a but and zinc nanoakvahelat. The results of preclinical testing of fungal product have revealed a positive impact not only on the growth of living biomass but also to increase to organism resistance to various infections diseases increase bakteriatsidnoy and lysozyme aktivnosti of blood serum, and this led to increased survival of juveniles **Conclusions.** The resulting protein-vitamin supplement containing zinc nanoakvahelat urluchay biochemical and immunological characteristics of animals. The experimental data allow to predict the effectiveness of using supplements as treatment and prevention to improve performance indicators and the natural resistance of farm animals.

Key words: biotechnology, vitamins, protein, food additiv.

УДК 57.085.23

ТАНАСІЄНКО І.В.¹, БУЗІАШВІЛІ Н.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: iratanasoenko@gmail.com

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТОМАТІВ (*SOLANUM LYCOPERSICON*) ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ

У результаті взаємодії із навколишнім середовищем рослинні організми зазнають впливу негативних абіотичних та біотичних факторів. Їх здатність протистояти стресовим умовам та адаптуватись до них, зберігаючи власний життєвий потенціал, залежить від реалізації захисних механізмів організму. Для багатьох сільськогосподарських культур, зокрема томатів, проблема комплексної довготривалої стійкості до цих стресових факторів досі не вирішена [2]. Оскільки плоди томатів широко використовують у харчуванні без попередньої термічної обробки, застосування традиційних хімічних засобів боротьби із фітопатогенами рослин, таких як інсектициди, фунгіциди та ін., значно обмежується, тоді як втрати врожаю внаслідок хвороб та ушкодження рослин і плодів шкідниками досягають 80%. Окрім того, додаткову загрозу для здоров'я людини становить вживання контамінованих продуктів, внаслідок синтезу патогенами токсинів, наприклад мікотоксинів, що характеризуються канцерогенними, мутагенними, тератогенними,

ембріотоксичними, алергічними, імуносупресорними ефектами [1].

Для вирішення даної проблеми необхідна селекція стійких до фітопатогенів сортів рослин. Однак томати вражаються більш ніж п'ятнадцятьма видами збудників хвороб, не враховуючи широкого ряду шкідників, що послаблюють захисну систему рослин та роблять плоди не придатними для використання в їжу. Альтернативою створенню сортів стійких до певних видів і штамів мікроорганізмів є підвищення системної стійкості рослин до широкого спектру патогенів та несприятливих факторів абіотичного походження. Для досягнення поставленого завдання використовують технології переносу протимікробних генів, зокрема лактоферину, до рослин-реципієнтів [7]. Лактоферин – глікопротеїн молекулярною масою 80 кДа, віднесений до родини трансферинів завдяки його здатності приєднувати та переносити іони заліза, секретується в організмі людини разом із молоком, слиною, жовчю, шлунковим соком, носовим слизом, сльозами, вагінальним