

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *HYROMYCES ROSELLUS* В СВЯЗИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В ПРАКТИКЕ

Разработаны методы выделения и изучены физико-химические характеристики компонентов клеточной стенки микофильного гриба *Hyromyces rosellus* – отхода получения красителя. Установлено, что основная часть приходится на полисахаридный хитин-глюкановый комплекс, который обладает сорбционными свойствами в отношении некоторых металлов. В клеточной стенке идентифицированы жирные кислоты, нафтахиноновые пигменты, углеводороды, воска, стерины, витамины группы В, и полноценные по аминокислотному составу белки.

Ключевые слова: микофильный гриб *Hyromyces rosellus*, хитин-глюкановый комплекс, хитозан, липиды, пигменты.

В общем объеме биотехнологической продукции значительная часть приходится на производство физиологически активных соединений, продуцируемых микроскопическими грибами. Вопросы утилизации грибного мицелия – отхода крупнотоннажных микробиологических производств остаются на сегодняшний день практически нерешенными. В то же время известно, что клеточные стенки большинства микроскопических грибов состоят из хитин-глюканового комплекса, содержат значительные количества белка, липидов, витаминов, разнообразные пигменты.

Микроскопический гриб *Hyromyces rosellus* 94/77 известен как продуцент красителя [1].

Целью данной работы явилось выделение, очистка и изучение физико-химических свойств остаточных компонентов отработанной биомассы гриба *Hyromyces rosellus* 94/77 – отхода получения красителя, а также изучение сорбции ионов Al^{3+} и Cu^{2+} отработанной биомассой и полисахаридным хитин-глюкановым комплексом клеточной стенки *Hyromyces rosellus*.

Объект и методы исследований

В работе использовалась отработанная биомасса *Hyromyces rosellus* 94/77, полученная по способу [1]. Выделение пигмента и липидных компонентов – согласно [2]. Определение физико-химических характеристик проводили с использованием спектральных методов анализа. ИК-спектры полученных соединений снимали на спектрофотометре ИК – Фурье ФСМ 1201 в области частот $500-4000\text{ см}^{-1}$ и ИК «Specord» М-80 спектр продукта снимали на KRS-стекле в виде пленки, внутренний стандарт тетраметилсилан (ТМС). УФ-спектр снимали на спектрофотометре «Specord» М-40, используя растворители хлороформ и метанол. ВЭЖХ по разделению пигмента проводили на хроматографе РЗ 1050. Масс-спектры получены на спектрометре МХ-1320; хрома-

то-масс-спектры – с использованием системы хроматограф-масс-спектрометр – ЭВМ: хроматограф НР 5890 с масс-селективным детектором НР 5972А. ГЖХ-анализ на хроматографе «Сhrom-5», колонка 1.2x3 мм 5% SE-30. ЯМР 1H снимали на приборе «Tesla BS-487 В» (60 МГц) в раств. CDCL внутр. станд. ТМС. Элементный анализ органических соединений (С, Н, N) проводился на элементном анализаторе Karlo Erda модели 1106. Биомассу определяли весовым методом. Белок в мицелии согласно [3]. Аминокислотный состав белка – на автоматическом аминокислотном анализаторе Т 339 М (Чехословакия). Гидролиз образцов проводили с 6 н. HCl при 105°C в течение 24 часов в запаянных под N_2 стеклянных ампулах, количественное определение триптофана проводили, используя метод Хорна [3], редуцирующие сахара, витамины, сырой жир – согласно [4]. Степень адсорбции меди согласно [5], алюминия – по ГОСТ 18165-89 «Метод определения массовой концентрации алюминия». Получение полисахаридного хитин-глюканового комплекса по методу [6].

Результаты и их обсуждение

Первоначально нами был исследован химический состав и биологическая ценность отработанной биомассы мицелия гриба. Определение суммарного белка показало, что его содержание не превышает 18-20%, причем основную часть составляет спирторастворимая фракция. На хроматограммах гидролизата белка мы получили все аминокислоты, как заменимые, так и незаменимые. Отмечалось наиболее высокое содержание аргинина, валина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и лизина. В мицелии были обнаружены такие витамины как тиамин в количестве 3 мг% и пиридоксин 4,9 мг%. На долю редуцирующих сахаров приходилось 30-32%. Содержание сырого жира составило 13-15% к весу сухой биомассы. С целью удаления остатков свободных и связанных с клеточной стенкой липи-

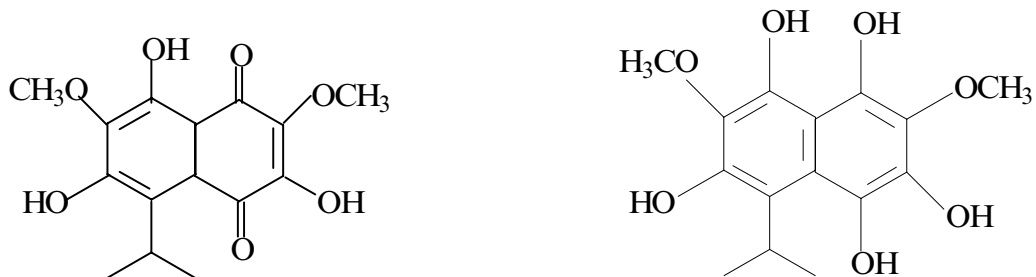


Рисунок 1

дов, а также остаточного количества пигмента биомассу мицелия последовательно обрабатывали органическими растворителями: гексаном, смесью хлороформ-изопропанол (2:1), смесью этанол-серный эфир (2:1). В результате проведения аналитической тонкослойной хроматографии установили, что в состав нейтральных липидов входят следующие соединения с $R_f = 0,1-0,2$ -диглицериды; $R_f = 0,3$ -высшие алифатические спирты; $R_f = 0,6$ -триацилглицериды; $R_f = 0,93$ -углеводороды. В хлороформную фракцию уходило большое количество пигмента, об этом мы судили по обесцвечиванию мицелия и окраски экстракта. Для осаждения пигмента использовали диэтиловый эфир. Содержание полярных липидов в этой фракции не превышало 3-4% от сухой биомассы, также отмечались следовые количества нейтральных липидов с $R_f = 0,05$ – (1-0-моноалкиловые эфиры глицерина); $R_f = 0,1$ – (стерины); $R_f = 0,3$ – (высшие алифатические спирты); $R_f = 0,6$ – (триацилглицериды); $R_f = 0,93 - 0,96$ – (углеводороды). Связанные с клеточной стенкой липиды экстрагировали в системе этанол– серный эфир (1:2). Установили, что их состав включает в себя следующие соединения: $R_f = 0,6$ -триацилглицериды; $R_f = 0,19$ -стерины; $R_f = 0,38$ -жирные кислоты; $R_f = 0,88$ – воска, $R_f = 0,99$. Исследован общий жирнокислотный состав связанных липидов и выявлено, что доминирующими являются пальмитиновая и олеиновая кислоты до 68% от суммы жирных кислот. Хромато-масс-спектр обнаружил в незначительных количествах 2 соединения стероидной структуры: 5-альфа-прегнан-3,15,20-трион и спироциклопропан-1,2¹ (1¹H)-фенантрен-1⁴(3¹H)-дион, 3¹, 7¹, 9¹. В со-

ставе гексановой и этанол-серноэфирных фракций, согласно данным хромато-масс-спектрометрии, находится смесь n-алканов C_{17} , C_{21} и C_{35} в соотношении 2:6:9, а хлороформные и этанольно-серноэфирные фракции содержат смесь n-алканов C_{13} , C_{14} , C_{17} , C_{21} , C_{26} , C_{28} , C_{35} в соотношении 2:7:4:8:6:1:6. Таким образом, связанные с клеточной стенкой липиды отличаются от внеклеточных липидов и эти различия касаются жирно-кислотного состава, состава углеводородов, наличия в клеточной стенке восков и стеринов.

Согласно данным ВЭЖХ, ЯМР ¹³C, ЯМР ¹H, ИК-, УФ-спектров и хромато-масс-спектров, по результатам элементного анализа связанный с клеточной стенкой пигмент имеет примерные структуры нафтахиноновых производных (рисунок 1).

На следующем этапе работы обезжиренную гомогенную массу мицелия подвергали последовательной обработке согласно [6] с целью получения полисахаридного хитин-глюканового комплекса, выход которого составил 44%. Согласно данным элементного анализа и ИК-спектроскопии можно сделать вывод, что полученный нами хитин весьма сходен с хитином, выделенным из панцирей ракообразных.

Нами был изучен процесс сорбции ионов Al^{3+} и Cu^{2+} . Показано, что биомасса – отход получения красителя – сорбировала из однокомпонентного раствора 55% алюминия и 77% меди. Полученный полисахаридный комплекс обладал наибольшей сорбционной способностью, степень извлечения ионов составила 89% алюминия и 96% меди соответственно.

4.08.2011

Список литературы:

1. Буракаева А.Д. Способ получения красителя. Патент РФ №2065462, опубл.20.08.96, бюл.№23.
2. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М. – 1975. – 406с.
3. Методы экспериментальной микологии. Справочник.-Киев.– 1982. – С. 225–249.
4. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – М. – 1982. – С.192–216, 277–278.
5. Лурье Ю.Ю.Химический анализ производственных сточных вод. – М. – 1974. – 464 с.
- 6.Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. и др. Получение из мицелиальных грибов полисахаридных комплексов и определение степени их деацетилирования.//Микробиология. – 1997. – Т. 66. – №1. – С. 84–89.

Сведения об авторах: **Буракаева Айгуль Дикатовна**, к.б.н., доцент, индивидуальный предприниматель
Карпова Галина Викторовна, д.б.н., доцент каф. общей биологии