

УДК 579.22:582.28:66.081

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *FUSARIUM SAMBUCINUM***Зайцева В.В.**УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»,
г. Витебск, Республика Беларусь

*По результатам проведенной работы автором статьи установлено, что мицелий гриба *Fusarium sambucinum* по составу представляет собой сбалансированный природой комплекс биологически активных веществ и как сырье может быть использован для получения субстанций с заданными свойствами.*

*It has been determined that *Fusarium sambucinum* mycelium is a balanced natural complex of biologically active substances and has proved to be a raw material for manufacturing substances with targeted features.*

Введение. Повышенному интересу к грибам способствовали многочисленные исследования, показавшие, что эти организмы могут стать незаменимыми источниками для получения лекарственных препаратов, имеющих ранозаживляющую, антиоксидантную, иммуномодулирующую и особенно антираковую активности [1-3]. Именно на основании этих достижений к 90-м годам прошлого столетия была создана новая область медицины – фармацевтическая микология. Биологическую активность большинства грибов во многом определяют соединения углеводной природы, содержание которых достигает 60% от сухой биомассы грибов [8].

Интересны эти соединения и как маркеры, имеющие существенное значение в систематике царства Fungi. Полисахариды (хитин и хитозан) – структурные компоненты клеточной стенки грибов, являются активным сорбентом токсинов и тяжелых металлов.

Широкое применение нашли грибные полисахариды в косметике для стимуляции или восстановления иммунной функции кожи.

В последнее время, при получении различных препаратов, предпочтение отдается глубинному мицелию, а не плодовым телам, поскольку глубинное культивирование позволяет получить экономически чистое сырье – субстанцию с заданными свойствами и в более короткие сроки.

В составе белка глубинного мицелия выявлены все незаменимые для человека аминокислоты, входящие в формулу сбалансированного питания. По аминокислотному составу белок глубинного мицелия более полноценен по сравнению с белком плодовых тел. В липидах глубинного мицелия преобладают непредельные жирные кислоты. В глубинном мицелии, как и в плодовых телах, накапливаются соединения ароматической природы. Наличие комплекса соединений обеспечивает высокую антиоксидантную активность экстрактов как плодовых тел, так и глубинного мицелия [4-7].

В биомассе многих микроскопических грибов хорошо сбалансированы по аминокислотному составу белки: они включают также витамины и липиды. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, что позволяет использовать их не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавку в пищу человека. Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяет использовать ее в качестве кормовой добавки в большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Содержание белков в грибной массе при использовании метода глубинного культивирования составляет 50-60% от сухой массы. Действие лекарственных грибов направлено на восстановление организма, защиту от стресса, реабилитацию.

Так, в России препараты на основе гриба рейши, сами грибы используются космонавтами для повышения работоспособности и восстановления организма после полета. Установлено, что использование экстрактов из китайских грибов, приводит к более эффективному усвоению кислорода клетками организма и позволяет спортсменам успешно выдерживать длительные физические нагрузки.

Эффективность экстрагирования БАВ в значительной степени зависит от природы микробиологического сырья, физико-химических свойств липидов и от вида комплексов, которые они образуют с другими классами соединений.

В настоящее время для повышения резистентности организма, а также снижения отрицательных последствий стрессов у человека, применяются препараты на основе компонентов гриба *Fusarium sambucinum*.

Несмотря на огромный потенциал лекарственных грибов, в Беларуси промышленное производство как самих грибов, так и функциональных препаратов на их основе, начинает только налаживаться.

В настоящее время разработку препаратов для ветеринарии планируется вести на основе компонентов гриба *Fusarium sambucinum*.

Цель настоящих исследований – дать характеристику химического состава глубинного мицелия гриба *Fusarium sambucinum* – экологически чистого сырья-субстанции с заданными свойствами.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований служит мицелий гриба *Fusarium sambucinum* ВКМФ 3051Д, выращенный глубинным способом в жидкой питательной среде, содержащей источник углерода 3,0%, азота 0,2%, фосфора 0,2 %, а также микроэлементы 0,07-0,08%, в стерильных условиях при температуре 26°C, при перемешивании и аэрации в течение 36 часов. На фильтрующей центрифуге отделяли выращенную биомассу мицелия гриба и выделяли из нее композицию биологически активных субстанций экстракцией органическим растворителем.

В работе использовали гриб *Fusarium sambucinum* ВКМФ 3051Д, который депонирован Всесоюзной коллекцией микроорганизмов ИБФН АН СССР.

Количественное содержание компонентов мицелия гриба обусловлено способом приготовления и пределом точности измерения, поскольку его состав определяется условиями роста гриба.

Для определения концентрации абсолютно сухой биомассы (АСБ) образцы сырого мицелия высушивали при температуре +105°C до постоянного веса.

Для определения содержания липидов в мицелии грибов навеску 10-20 г сырого мицелия растирали в ступке при глубоком замораживании жидким азотом. Полученную гомогенную массу исчерпывающе экстрагировали растворителями, в качестве которых были использованы: этанол, хлороформ, ацетон и система хлороформ: этанол: вода (1: 2: 0,8). Экстрагирование системой хлороформ: этанол: вода (1,0: 2,0: 0,8) проводилось в течении 10-12 часов, затем мицелий отфильтровывали на обеззоленном бумажном фильтре и измеряли объем смеси. Для отделения хлороформенной фазы на каждые 9 мл экстракта добавляли по 2,5 мл хлороформа и воды, и оставляли на 4-6 ч для расслоения. Нижнюю хлороформенную фракцию, содержащую общие липиды, собирали, выпаривали на роторном испарителе и определяли их количественное содержание весовым методом.

Качественный и количественный состав жирных кислот изучали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Хром-5» с пламенно- ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS (0,16-0,20 мм) с 15% полиэтиленгликольсукцинатом в качестве жидкой фазы, при программировании температуры колонки - 160°C, испарителя - 210°C. В качестве газа носителя использовали гелий (30 мл/мин). смесь метиловых эфиров очищали методом препаративной хроматографии на колонках с силикагелем L 40/100 (Чехия) в системе гексан: диэтиловый эфир (19:1 по объему). Идентификацию эфиров жирных кислот проводили по относительным объемам удерживания, а также в сопоставлении с показателями контрольных метиловых эфиров чистых жирных кислот. Степень ненасыщенности липидов (СН) определяли по формуле (1):

$$СН = [1 \times (\% \text{ моноены}) + 2 \times (\% \text{ диены}) + 3 \times (\% \text{ триены})] / 100, \quad (1)$$

где

% моноены – суммарное содержание жирных кислот с одной двойной связью в углеводородной цепочке;

% диены – с двумя двойными связями;

% триены – с тремя двойными связями.

Содержание фосфолипидов (ФЛ) в общих липидах определяли после их сжигания (0,25 мг) в 42% хлорной кислоте, и с последующим добавлением 1,25% молибдата аммония и 5% аскорбиновой кислоты. Реакция идет при кипячении в течение 5 мин. экстинкцию окрашенных растворов измеряли спектрофотометрически на СФ-16 при длине волны 897 нм и по калибровке определяли концентрацию неорганического фосфора (Р) в образце, массовую долю ФЛ рассчитывали по формуле (2):

$$ФЛ = Р \times К, \quad (2)$$

где

Р – количество фосфора в мкг,

К=22,6 – коэффициент пересчета на органическое вещество.

Содержание фосфолипидов в мицелии определяли на основании расчета содержания фосфора в общих липидах. Содержание эргостерина определяли по методу Либермана – Бурхарда в модификации Проскуракова [20]. Для этого аликвоту хлороформенной фракции, содержащей 25 мг общих липидов, выпаривали на роторном испарителе и перерастворяли в 10 мл гексана. Затем отфильтровывали на фильтре Шота и перерастворяли в бензоле. Для протекания реакции добавляли уксусноокислый ангидрид и концентрированную серную кислоту. Степень поглощения раствора измеряли при длине волны 670 нм на ФЭКе и рассчитывали содержание эргостерина в определяемом образце по формуле (3):

$$ЭРГ = E \times Л \times V, \quad (3)$$

где

E – экстинкция;

К – коэффициент;

V – объем бензольного раствора, мл.

Общий азот в мицелии грибов определяли по Кьельдалю. На основании данных о концентрации азота в мицелии рассчитывали содержание общего белка ($N \times 6,25$). Аминокислотный состав белка исследован на анализаторе «AAA-881» («Microtecha», Чехия).

Определение содержания полисахаридов в мицелии грибов осуществляли фенол-серноокислотным методом. Для этого, измельченную навеску сухого мицелия в количестве 100 мг помещали в пробирку объемом 20 мл, приливали 5 мл 1 М NaOH, закрывали пробкой и экстрагировали в термостате при 60°C в течение 1 ч, периодически помешивая. Полученный экстракт центрифугировали 20 мин при 8000 об/мин. осадок отделяли и в супернатанте определяли содержание полисахарида фенол-серноокислотным методом. 1,0 мл супернатанта переносили в пробирку объемом 20 мл, добавляли 1,0 мл 5% водного раствора фенола и тщательно перемешивали. К полученному раствору быстро добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты при непрерывном встряхивании. Давали раствору отстояться в течение 10 мин, перемешивали и помещали в водяную баню при 25-30°C на 10-20 мин. измерения вели на фотоэлектроколориметре при 490 нм, в кювете 5 мм. Контролем служил раствор, содержащий вместо супернатанта 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 5% водного раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты.

Для получения экстрактов с целью определения фенольных соединений глубинный мицелий тонко измельчали, многократно замораживали жидким азотом и исчерпывающе экстрагировали 70% этиловым спиртом в течение 30 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником до отрицательной пробы на содержание фенольных соединений. Полученный экстракт центрифугировали при 8000 об/мин (15 мин). Сумму моно- и полифенолов определяли с реактивом Фолина-Дениса.

Массовую долю сухих веществ и влаги в процентах определяли по ГОСТ 3626-73. величину pH устанавливали по ГОСТ 26781-85. массовую долю витамина В₁ мг/100 г устанавливали по ГОСТ 30627.5-98. массовую долю витамина В₂ мг/100 г определяли по ГОСТ 30627.6-98. определение массовой доли витаминов В₁₂, В₆, РР осуществляли по МР 01-191137-17-95.

Результаты исследований. Высшие мицелиальные грибы *Fusarium sambucinum* благодаря своему составу и ярко выраженным полифункциональным лечебно-профилактическим свойствам обладают способностью нормализовать работу различных органов и систем человеческого организма и давно известны как самостоятельно существующие биологически активные препараты, так называемые нутрицевтики, используемые в медицине для лечения и профилактики различных заболеваний, а также в косметике для оздоровления и омоложения кожных покровов.

Ниже, в таблице 1, представлены сведения о химическом составе мицелия гриба *Fusarium sambucinum*.

Таблица 1 - Химический состав мицелия гриба *Fusarium sambucinum*

№ п/п	Основные показатели	Ед. измерения, масс. %
1	Сырой протеин	42-44
2	Истинный белок	28-32
3	Углеводы	18-20
4	Липиды	5-7
5	Нуклеиновые кислоты	3-4
6	Влажность	4-5
7	Зола	5-6

Из материалов таблицы 1 видно, что глубинный мицелий гриба в основном состоит из белкового и углеводного компонентов. Липидный компонент в составе мицелия составляет 5-7%

В таблице 2 представлен аминокислотный состав гриба *Fusarium sambucinum*. Содержание аминокислот в % к абсолютно сухому веществу (АСВ).

Таблица 2 - Содержание аминокислот в мицелии гриба *Fusarium sambucinum*

Аминокислота	Содержание, %	Аминокислота	Содержание
лизин	2,0-2,4	аргинин	1,4-1,6
метионин	0,6-0,7	гистидин	0,6-0,9
триптофан	0,3-0,4	аспараг.кислота	2,4-2,8
валин	1,5-1,7	глутамин.кислота	3,6-4,0
фенилаланин	0,9-1,1	аланин	2,2-2,5
лейцин	1,6-1,8	серин	1,2-1,4
изолейцин	0,8-0,9	пролин	0,7-0,8
тирозин	0,8-0,9	глицин	1,2-1,4
треонин	1,5-1,7	цистин	0,3-0,4

Из данных представленных в таблице 2 видно, что глубинный мицелий гриба *Fusarium sambucinum* содержит все 18 аминокислот, входящих в формулу сбалансированного питания. В значительном количестве в них присутствуют лизин, Валин, лейцин, треонин, аргинин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин, содержание которых составляет от 1,5 до 4,0% (к АСВ). По аминокислотному составу белок глубинного мицелия более полноценен по сравнению с белком плодовых тел.

На долю незаменимых аминокислот приходится 40-44% общей суммы аминокислот сухого мицелия гриба.

В состав углеводов мицелия входит хитиновая клетчатка, адсорбирующая токсины и шлаки, биологически активные полисахариды (гликаны: глюканы и галактоманны), регулирующие работу иммунной системы. В состав мицелия гриба *Fusarium sambucinum* входят оксалиновая, яблочная, лимонная, янтарная и другие органические кислоты.

Таблица 3 - Состав липидной фракции гриба *Fusarium sambucinum*

№ п/п	Компоненты	Содержание, мг/г
Фосфолипиды:		
1	Фосфатидилсерин	0,6-0,7
2	Фосфатидилхолин (лецитин)	7,5-8,8
3	Фосфатидилэтаноламин (кефалин)	3,0-3,2
Стерины:		
4	22,23-дигидроэргостерин	1,1-1,3
5	Эргостерин	1,0-1,4
6	5-дигидроэргостерин	0,21-0,24
Ненасыщенные жирные кислоты:		
7	Пальмитолеиновая С (16:1)	0,4-0,46
8	Олеиновая С (18:1)	7,8-10,08
9	Линолевая С (18:2)	14,2-16,5
10	Линолевая С (18:3)	1,48-2,3
11	Убихиноны Q ₁₀ -Q ₉	0,1-0,12

Из таблицы 3 следует, что липидная фракция гриба содержит такие физиологически активные вещества, как фосфолипиды, стерины, глицериды, жирные кислоты и убихинон. При этом более 50% жирных кислот приходится на долю эссенциальных жирных кислот – линолевой и линоленовой, которые не синтезируются организмом животных и человека и должны поступать в них с пищей.

Таблица 4 - Содержание витаминов в мицелии гриба *Fusarium sambucinum*

№ п/п	Витамин	Содержание, мг/г
1	В ₁ (тиамин)	8-10
2	В ₂ (рибофлавин)	45-50
3	В ₃ ,РР	220-240
4	В ₄ (холин)	Следы
5	В ₅ (пантотеновая кислота)	32-44
6	В ₆ (пиридоксин)	8-12
7	В ₉ (фолиевая кислота)	8-13
8	Биотин	0,6-1,0
9	В ₁₂ (кобаламин)	4-5

Как видно из данных, сведенных в таблице 4 гриб *Fusarium sambucinum* содержит полный комплекс витаминов группы В, с недостатком которого связывают сбои функции нервной системы, кожи, слизистых оболочек кишечника, сосудистой системы и кровеносных органов. Кроме того, витамины группы В играют важную роль в процессах белкового, липидного и углеводного обменов.

В состав мицелия гриба *Fusarium sambucinum* входят полный набор макро- и микроэлементов в легкоусвояемой форме. Эти минеральные элементы находятся в виде органических соединений и их комплексов.

В таблице 5 представлен минеральный состав гриба *Fusarium sambucinum*.

Таблица 5 - Минеральный состав мицелия гриба *Fusarium sambucinum*

Элемент	Содержание в сухом мицелии в мг/г
натрий	0,7-1,2
калий	14,9-18,2
кальций	19,5-26,1
магний	1,8-2,1
фосфор	11,2-18,8
железо	0,4-0,5
	Содержание в сухом мицелии в мкг/г
цинк	24,5-38,5
медь	10,8-16,3
марганец	31,2-46,4
кобальт	1,0-1,8
никель	2,5-6,9
хром	3,6-5,5
молибден	0,8-1,7

Заключение. 1. В результате исследований химического состава образцов сухого глубинного мицелия *Fusarium sambucinum* установили, что он содержит 18 аминокислот, биологически активные полисахариды, органические кислоты, липиды, витамины и полный набор макро- и микроэлементов в легкоусвояемой форме.

2. липидная фракция гриба *Fusarium sambucinum* содержит такие физиологически активные вещества, как фосфолипиды, стерины, глицериды, жирные кислоты и убихинон. При этом более 40% жирных кислот приходится на долю эссенциальных жирных кислот- линолевой и линоленовой.

3. по составу компонентов, глубинный мицелий гриба *Fusarium sambucinum* представляет собой натуральный, сбалансированный природой, комплекс биологически активных веществ и может быть использован в качестве экологически чистого сырья для получения субстанций с заданными свойствами.

Литература. 1. Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Вассер С.П., Михайлова О.Б. Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов // Успехи медицинской микологии. -Т.5.- М.: Национальная академия микологии, 2005. – С. 254-256. 2. Краснопольская Л.М., Белицкий И.В., Антимонова А.В. и др. Лекарственные базидиальные грибы: биотехнология культивирования и противоопухолевые свойства // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы Третьего Московского Межд. Конгресса. Москва, 14-18 марта 2005 г. – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2005. Ч.2-С.72-73. 3. Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р., Самусенко Л.В. Пути создания некоторых лекарственных препаратов из микро- и макромицетов // Успехи медицинской микологии. -Т.5.- М.: Национальная академия микологии, 2005. – С. 206-210. 4. Панченко А., Спиридонова В., Деникин М. и др. Изучение иммуномоделирующего и противоопухолевого действия высших грибов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы Третьего Московского Межд. Конгресса. Москва, 14-18 марта 2005 г. – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2005. Ч.2-С.137-138. 5. Феофилова Е.П. Микология в Институте микробиологии РАН: история и перспективы развития //Микробиология. - 2004.-Т. 35,№5.-С. 674-686. 6. Филиппова И.А., Фунтик Т.В. Фунготерапия – естественная медицина будущего // Успехи медицинской микологии. -Т.5.- М.: Национальная академия микологии, 2005. – С. 279-281. 7. Шамцян М., Попов А., Панченко А. и др. Изучение гипохолестеринемического эффекта высших базидиомицетов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы Третьего Московского Межд. Конгресса. Москва, 14-18 марта 2005 г. – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2005. Ч.2-С.168-169. 8. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective (Review) // Critical Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 1. – P. 65-96.

Статья поступила 20.09.2010г.