

Получение насыщенных углеводов путём глубинного культивирования микофильного гриба *Hypomyces rosellus*

А.Д. Буракаева, к.б.н., **Р.Ф. Сагитов**, к.т.н., **Е.В. Левин**, к.ф-м.н., ОАО «НИПИЭП»; **Н.С. Егоров**, д.б.н., профессор, МБЦ МГУ; **И.Д. Алямов**, к.с.-х.н., Оренбургский ГАУ

Ресурсы горючих полезных ископаемых, которые накапливались биосферой более 300 млн лет, в настоящее время находятся на стадии постепенного истощения. Согласно мнению некоторых учёных, обеспеченность мировыми запасами обычной нефти (без учёта запасов битумов) не превышает два-три столетия [1, 2].

Поиск конкурирующих источников энергии, в частности использование биомассы микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, частей растений, а также отходов животных для получения различных видов биотоплива, является важным направлением современных исследований в области биотехнологии.

Микроскопические грибы способны накапливать значительное количество липидов, преобладающими фракциями которых являются триглицериды и углеводороды.

Цель работы — получение углеводов путём глубинного культивирования двух штаммов мико-

фильного гриба *Hypomyces rosellus* и изучение их структурных особенностей.

Объекты и методы исследований. В работе использовались штаммы микофильного гриба *Hypomyces rosellus* А2 (ВКПМ F-242) и А3 (коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова).

Штаммы микофильного гриба выращивали на питательных средах и в условиях культивирования, описанных ранее [3, 4]. Экстракцию углеводородных компонентов проводили последовательно петролевым эфиром и смесью хлороформ-изопропанол (1:2) [5]. Для разделения и идентификации углеводов использовали метод аналитической тонкослойной хроматографии и препаративной тонкослойной хроматографии с использованием следующих систем растворителей: петролеинный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота 8:2:0,1; петролеинный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота 9:1:0,1; гептан — бензол 9:1.

Физико-химические характеристики определяли с использованием спектральных методов анализа. ИК-спектры полученных соединений

снимали на спектрофотометре ИК – Фурье ФСМ 1201 в области частот 500–4000 см⁻¹. Хромато-масс-спектр снимали с помощью системы хроматограф-масс-спектрометр – ЭВМ: хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5972A. Условия анализа: капиллярная кварцевая колонка Ultra – 250 м × 0,2 мм, привитая фаза 5% PhMeSiO₂, начальная температура 30°C, скорость подъёма 10°/мин., конечная 300°C, расход газа-носителя N₂ 1 мл/мин., температура испарителя 305°C. Сканирование спектров производили со скоростью 1 спектр/с, диапазон сканирования составлял 39–500 а.е.м.

Компьютерную обработку данных осуществляли на ChemStation HPMS, интерпретацию масс-спектров – при помощи библиотечных данных, на основе спектро-структурных корреляций, а также на основании закономерностей и особенностей фрагментации тритерпеновых соединений. Элементный анализ органических соединений (C, H, N) проводили на элементном анализаторе Karlo Erda модели 1106.

Результаты исследований. После культивирования в глубинных условиях в течение 48–120 час. на всех испытуемых питательных средах в культу-

Разделение липидной фракции культуральной жидкости *Hypomyces rosellus* методом аналитической тонкослойной хроматографии [5]

Система растворителей	Экстракт	Rf			
		сутки			
		2	3	4	5
1. Петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота, 8:2:0,1;	петролейно-эфирный	0,83	0,98	0,87	0,95
		0,91		0,98	
	хлоформный	0,83	0,96	0,98	0,87
		0,95			0,95
2. Петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота, 9:1:0,1;	петролейно-эфирный	0,93			0,95
	хлоформный	0,91			0,95
3. Гептан – бензол, 9:1;	петролейно-эфирный	–	0,81 0,96	0,90	–
	хлоформный	–	–	–	–

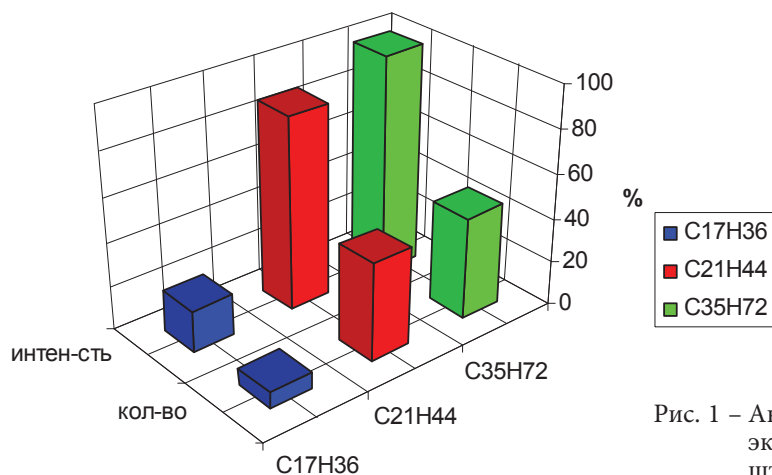
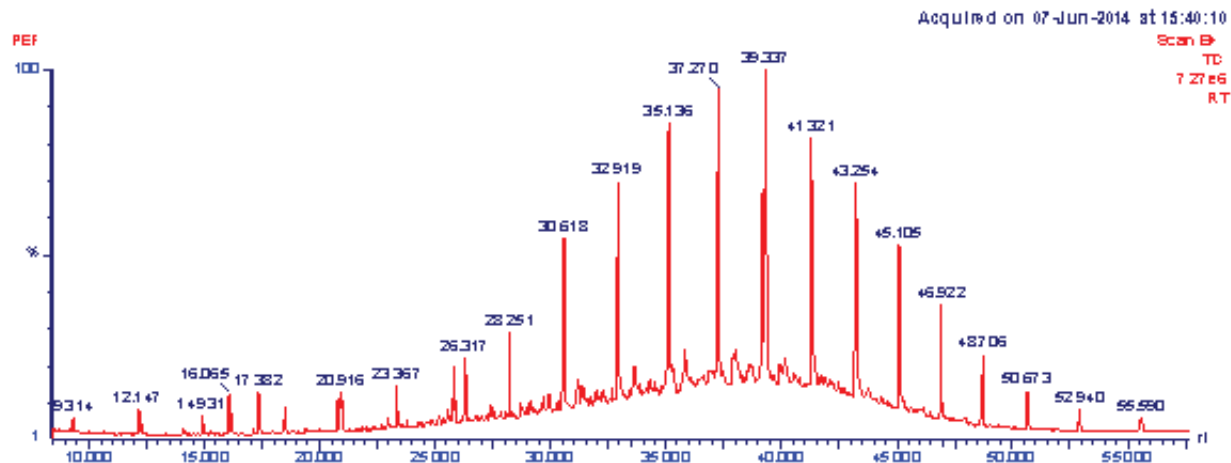


Рис. 1 – Анализ компонентов петролейно-эфирного экстракта культуральной жидкости гриба штамма А 3 *Hypomyces rosellus*

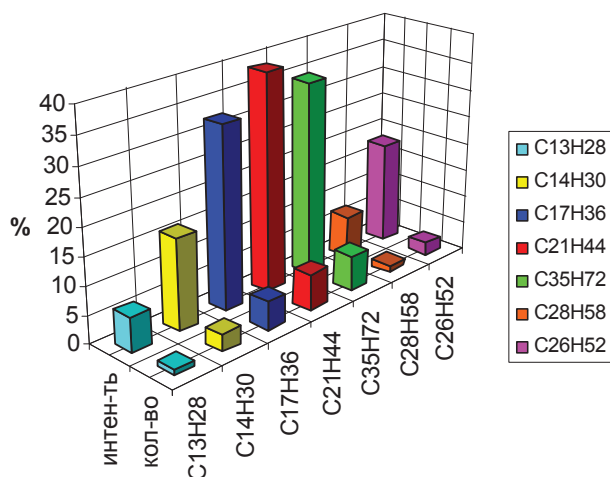


Рис. 2 – Анализ компонентов петролейно-эфирного экстракта культуральной жидкости гриба штамма А 2 *Hypomyces rosellus*

ральной жидкости микофильного гриба *Hypomyces rosellus* накапливались липидные фракции, содержащие смесь углеводов и нейтральных липидов, причём биосинтез зависел от состава питательных сред и времени культивирования гриба.

Как видно по таблице, во всех системах растворителей максимальная концентрация липидной массы шла с фронтом растворителя, оставляя на пластинке лишь слабые следы. Наиболее чётко проявились после обработки проявителем пятна со следующим $R_f = 0,91–0,98$ (соответствуют углеводам парафинам и олефинам), помимо этих пятен присутствовали пятна со значением $R_f = 0,80–0,88$, которые соответствуют воскам.

По данным хромато-масс-спектров в петролейно-эфирной фракции экстракта культуральной жидкости штамма А 3 *Hypomyces rosellus*, выращенного на средах сложного состава, преобладают углеводороды $C_{17}H_{36}$, $C_{21}H_{44}$, $C_{35}H_{72}$ (рис. 1). Причём большая часть сигналов имеет одинаковые

брутто-формулы, что обуславливает их близкое строение. По данным элементного состава, отмечено присутствие до 85% углерода и 14% водорода. Петролейно-эфирная фракция культуральной жидкости штамма А 2 *Hypomyces rosellus* отличалась более разнообразным содержанием насыщенных углеводов линейного строения, но в количественном отношении содержание их было меньше (рис. 2).

Таким образом, мицелиальный гриб *Hypomyces rosellus* способен синтезировать насыщенные длинноцепочечные углеводороды преимущественно линейного строения. Продуцент синтезирует углеводороды на питательных средах сложного состава (в которых в качестве единственного источника углерода используют соевую муку или пшеничные отруби). Существенным отличием проведённых нами исследований является тот факт, что в качестве компонентов питательной среды для культивирования продуцента насыщенных углеводов используются целлюлозосодержащие отходы зерноперерабатывающей промышленности.

Проблема получения энергии из биомассы микроорганизмов стала актуальной, поскольку положительных сторон для использования гораздо больше, чем отрицательных. Однако в действительности пока воплощается лишь небольшая часть проектов, направленных на практическую реализацию таких решений.

Литература

1. Арутюнов В.С. Биотопливо: новая энергетика или модное увлечение? // Химия и жизнь. 2008. № 5. С. 27–32.
2. Байков Н.М. Запасы нефти и объёмы её добычи в мире и по отдельным регионам // Нефтяное хозяйство. 2004. № 4. С. 131–133.
3. Буракаева А.Д., Ахметова В., Абдуллин М.И., Мухсинова Б.Х., Хусаинов А.Н. Патент Российской Федерации / Патент на изобретение № 2439158 от 10.01.2012.
4. Буракаева А.Д. Микофильные грибы – продуценты практически важных продуктов. Оренбург: НОУ ВПО МТИ «ВТУ», 2013. 160 с.
5. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. С. 59, 160, 187, 296, 322.