

К.В. Витко

**ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
ГРИБОВ ASCOMYCOTA С ЦЕЛЮ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭКСКРЕТИРУЕМЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Научный руководитель: ассист. А.С. Космач

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

K.V. Vitko

**RESEARCHING OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF ASCOMYCOTA
FUNGI CULTURAL LIQUID FOR THE PURPOSE OF DETECTION
OF EXCRETE BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

Tutor: assistant A.S. Kosmach

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Синтезированные препараты различных групп антибиотиков имеют свои негативные свойства, а натуральные биологически активные препараты из грибов безвредны, не дают побочных результатов и, вместе с тем, могут обладать сильными лечебными свойствами. Поэтому перспективным направлением становится создание препаратов на основе композиций грибов, составляющие которых будут дополнять и усиливать возможности друг друга, тем самым положительно влияя на макроорганизм.

Ключевые слова: препарат, Ascomycota, биуретовый метод, антиоксиданты.

Resume. Synthesized preparations of various groups of antibiotics have their own negative properties, and natural biologically active preparations from mushrooms are harmless, do not give side effects, and, at the same time, can have strong medicinal properties. Therefore, a promising direction is the creation of preparations based on compositions of mushrooms, the components of which will complement and enhance each other's capabilities, thereby positively affecting the macroorganism.

Keywords: medicine, Ascomycota, biuret method, antioxidants.

Актуальность. Одной из важнейших задач современной биотехнологии является поиск новых источников физиологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных продуктов. В последнее время вырос интерес к биологически активным добавкам на основе экстрактов грибов, а также создание препаратов БАВ, которые экскретируются грибами [1]. Однако, количество таких препаратов на основе БАВ грибов, выпускающихся в промышленном масштабе невелико, т.к. испытания активности большинства известных БАВ на людях пока не проводились. Поэтому перспективным направлением становится создание препаратов на основе композиций грибов, составляющие которых будут дополнять и усиливать возможности друг друга, тем самым положительно влияя на макроорганизм. Такие препараты могут быть предназначены для укрепления иммунитета, восполнения витаминной и минеральной недостаточности, повышения физической работоспособности [2].

Цель: провести анализ химического состава культуральной жидкости грибов видов *Aspergillus fischeri* Wehmer, *Trichoderma viride* Pers., *Ulocladium chartarum* (Preuss) E.G. Simmons и оценить общую антиоксидантную активность с целью

дальнейшего исследования и получения экскретируемых биологически активных веществ.

Задачи:

1. Определить содержание химических веществ в культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Ulocladium* с помощью биуретового и ферментативного методов.

2. Оценить общую антиоксидантную активность культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Ulocladium* по содержанию веществ, обладающих восстанавливающими свойствами.

3. Определить общее содержание фенольных соединений в культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Ulocladium*. Провести тонкослойную хроматографию культуральной жидкости с целью проведения качественной характеристики фенольной фракции.

Материал и методы. Объектами исследования являлись культуральные жидкости видов *Aspergillus fischeri* Wehmer, *Trichoderma viride* Pers., *Ulocladium chartarum* (Preuss) E.G. Simmons. Растворы предварительно были центрифугированы. Согласно нормативам [3] было проведено:

1) Определение относительной антиоксидантной активности по содержанию веществ, обладающих восстанавливающими свойствами. Показателем относительной АОА является объем экстракта в миллилитрах, израсходованный на титрование 1 мл 0,05 Н раствора перманганата калия. Чем меньше объем препарата, израсходованный на титрование, тем выше антиокислительная активность препарата.

2) Определение содержания белка биуретовым методом. Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди.

3) Определение содержания глюкозы ферментативным методом. Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди.

4) Определение содержания фенольных соединений в культуральной жидкости с помощью спектрофотометрического метода. Реакционную смесь готовили смешивая 0,5 мл культуральной жидкости (концентрация 1 мг/мл), 2,5 мл 10% реактива Фолина-Чокальтеу и 2,5 мл 7,5% NaHCO_3 . В качестве оптического контроля использовали реакционную смесь, содержащую 0,5 мл этанола, 2,5 мл 10% реактива Фолина-Чокальтеу и 2,5 мл 7,5% NaHCO_3 . После этого пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 40 мин. Поглощение реакционной смеси определяли с помощью спектрофотометра при $\lambda = 765$ нм

Для построения калибровочной прямой использовали растворы танина с точно известной концентрацией.

На основании измеренной оптической плотности проб рассчитывали концентрацию фенольных соединений при помощи калибровочной прямой (мг/мл), а затем содержание фенольных соединений в культуральной жидкости (F) выражали в мг танина/мл среды культивирования.

5) Разделение фенолов методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинах Aldrich. Для разделения смеси фенолов на силикагеле

использовали три системы элюентов:

- (I) хлороформ–этанол–уксусная кислота (90:10:1);
- (II) хлороформ–этилацетат–уксусная кислота (50:50:1);
- (III) ацетонитрил-вода (70:30).

Смесь растворителей готовили в хроматографическом стакане непосредственно перед разделением.

Для хроматографирования использовали пластины силикагеля Aldrich TLC plates, silica gel on aluminium (США) размером 3 см×10см. На пластинке проводили две линии: линию старта на расстоянии 1 см от края и линию фронта растворителя на расстоянии 0,5 см от противоположного края. Разделяемые растворы фенолов наносили на линию старта, высушивали и погружали пластину в стакан с подвижной фазой, закрывали притёртой крышкой. Хроматографирование проводили до достижения растворителем отмеченной линии фронта.

После высушивания пластины фотографировали в УФ-свете

Результаты и их обсуждение.

1) По итогам результатов видно, что наибольшей антиоксидантной активностью обладает проба с культуральной жидкостью *Trichoderma viride Pers.*, в то время как в пробе с *Aspergillus fischeri Wehmer* выявлено наименьшее проявление АОА.

Таким образом, экспериментально установлено содержание биологически активных веществ обладающих АОА в культуральной жидкости грибов.

В результате проведенной биуретовой реакции было определено, что в пробе *Trichoderma viride Pers.* - самое высокое содержание белка, в то время как в пробе *Ulocladium chartarum (Preuss) E.G. Simmons.* – самое низкое.

3) Установлено, что *Trichoderma viride Pers.* содержит небольшое количество глюкозы, в то время как *Ulocladium chartarum (Preuss) E.G. Simmons.* и *Aspergillus fischeri Wehmer.* не содержат глюкозу (таблица 1).

Табл. 1. Содержание белка и глюкозы в культуральной жидкости грибов

Гриб	Содержание белка, г/л	Содержание глюкозы, ммоль/л
<i>Ulocladium chartarum (Preuss) E.G. Simmons.</i>	1,958 ±0,2	-
<i>Aspergillus fischeri Wehmer.</i>	2,002±0,18	-
<i>Trichoderma viride Pers.</i>	3,264±0,24	0,300± 0,09
Среда Чапека (среда культивирования)	1,382 ± 0,34	162± 12,8

Как видно из полученных результатов, основным питательным веществом для исследованных грибов является глюкоза. В культуральной жидкости после культивирования она практически отсутствует, в незначительной концентрации обнаружена в культуральной жидкости гриба *Trichoderma viride Pers.*

Содержание белка в культуральной жидкости после выращивания грибов значительно увеличивается от 145% (по сравнению со средой Чапека) в среде

культивирования *Ulocladium chartarum* до 245% (по сравнению со средой Чапека) - в среде *Trichoderma viride*. Это свидетельствует о секреции белков в культуральную жидкость, причем при культивировании *Trichoderma viride* выделение белков в культуральную жидкость происходит в больших количествах.

4) Фенолы являются наиболее активными антиоксидантами, а многие из природных фенольных соединений могут проявлять противовоспалительную, иммуномодулирующую и некоторые другие биологические активности, обладают противовирусными, бактерицидными и бактериостатическими свойствами.

В таблице №2 приведены результаты определения содержания фенольных соединений в исследуемых культуральных жидкостях.

Табл. 2. Содержание фенольных соединений в культуральной жидкости

Культуральная жидкость	Содержание фенольных соединений, мг танина в 1 мл жидкости
<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) E.G. Simmons.	±
<i>Aspergillus fischeri</i> Wehmer.	±
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	±
Среда Чапека (среда культивирования)	±

Как видно из результатов, наиболее высокое содержание фенольных соединений характерно для культуральной жидкости *Ulocladium chartarum*. В последующем изучении это согласуется с данными тонкослойной хроматографии.

5) В культуральных жидкостях *Ulocladium chartarum* и *Trichoderma viride* заметны как минимум две фракции фенольных соединений, которые разделяются в системе хлороформ–этанол–уксусная кислота (90:10:1), которая позволила добиться наилучшего разделения веществ (рисунок 1).



Рис. 1 – Хроматограмма культуральной жидкости грибов в системе разделения фенолов хлороформ–этанол–уксусная кислота (90:10:1).
1. – *Aspergillus fischeri*; 2. – *Ulocladium chartarum*; 3. – *Trichoderma viride*

В результате работы было выявлено, что грибы рода *Ulocladium chartarum* (Preuss) E.G. Simmons., *Aspergillus fischeri* Wehmer., *Trichoderma viride* Pers. синтезируют вещества, обладающие антиоксидантными свойствами; могут проявлять также противовоспалительную, иммуномодулирующую и некоторые другие биологические активности, что свидетельствует о возможности их использования для получения экскретируемых биологически активных веществ, что в дальнейшем может быть использовано в медицине и фармакологии в качестве полноценной замены синтезированных препаратов различных групп антибиотиков.

В этом направлении я и планирую проводить дальнейшие исследования и развивать работу.

Выводы:

1. Изучен химический состав культуральной жидкости грибов *Ulocladium chartarum* (Preuss) E.G. Simmons., *Aspergillus fischeri* Wehmer., *Trichoderma viride* Pers.. Выявлено значительное выделение белков в культуральной жидкости культивируемых грибов, а также содержание глюкозы в этих растворах

2. Определено содержание фенольных соединений в культуральной жидкости культивируемых грибов. Наиболее высокое содержание фенольных соединений характерно для культуральной жидкости *Ulocladium chartarum*.

3. Выявлено, что культуральные жидкости грибов *Ulocladium chartarum* и *Trichoderma viride*, которые характеризуются наиболее высокой концентрацией фенольных соединений, проявляют наибольшую антиоксидантную активность.

Литература

1. Constituents from the fruiting bodies of *ganoderma applanatum* and their aldose reductase inhibitory activity / S.-H. Lee et al. // Archives of pharmacal research. – 2006. – № 29 (6). – P. 479-483.
2. Zhong, J.-J. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction / J.-J. Zhong, J.-H. Xiao // Advances in biochemical engineering/biotechnology. – 2009. – Vol. 113. – P. 79-150.
3. Альгология и микология: метод. указания к лабораторным занятиям / авт.-сост.: А. И. Стефанович [и др.]. – Минск: БГУ, 2009. – 30 с.