

УДК 582.284:547.466:573.6

Ջ.Ա. ՄԱՆՏԱՅՅԱՆ, Լ.Գ. ԱՆԱՅՆ, Մ.Ա. ԴԱՎՅԱՆ

## СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *FLAMMULINA VELUTIPES*, КУЛЬТИВИРУЕМОГО ГЛУБИННО НА ОТХОДАХ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Изучены особенности роста базидиального гриба *Flammulina velutipes* в условиях глубинного культивирования на питательных средах, содержащих в качестве компонентов комплексных сред отходы пищевой промышленности: молочную сыворотку, фруктовые жомы, растительные отвары, гидролизат подсолнечной лузги. Показано, что в процессе роста культуры существенные изменения претерпевают спирторастворимые аминокислоты мицелия. В трехсуточном мицелии резко снижается содержание асп и возрастает количество лиз-гис, арг, тир, в особенности ала, глу, вал-мет. Существенное повышение незаменимых аминокислот лиз, лей и мет является положительным фактором в оценке питательных сред.

Биотехнология глубинного культивирования съедобных базидиомицетов основывается на принципе получения грибных продуктов с естественными вкусовыми качествами, без отрицательных для здоровья человека последствий, что, в первую очередь, определяется количеством содержащегося белка, синтезируемого биомассой, его качественным составом и усвояемостью.

При создании биотехнологической системы первостепенное значение приобретает поиск штаммов – эффективных продуцентов, а также подбор питательных сред, обеспечивающих оптимальные условия для процесса. По литературным данным [1–3], мицелиальная биомасса базидиомицетов, выращенных на отходах растительного происхождения, не является токсичной (в отличие от культивируемых плесеней). Мицелий грибов, добавленный в изделия из риса, кукурузы, обогащает их белком, рибофлавином, никотиновой кислотой, лизином, триптофаном. В настоящее время уже осуществляются 10–25%-ные добавки глубинно выращенного мицелия в мясные продукты, в плавленые и копченые сыры, овощные консервы и хлебобулочные изделия [1–3].

При глубинном культивировании съедобных базидиомицетов с использованием дешевых и недефицитных источников питания, таких как молочная сыворотка, фруктовые и овощные жомы и др., образуется биомасса с приятным грибным ароматом, высоким содержанием сырого протеина (до 50%) [4–6].

В настоящей работе исследована возможность использования комплексных питательных сред, являющихся, по сути, доступными и недорогими сельскохозяйственными отходами, как-то: молочная сыворотка, отвары фруктового (грушевого) жома и зеленой растительной массы, гидролизат подсолнечной лузги, для глубинного выращивания базидиомицетов с последующим изучением аминокислотного состава биомассы в процессе роста культуры.

**Материал и методика.** В работе использовали культуру гриба *Flammulina velutipes* (опенок зимний, зимний гриб)\*, которую поддерживали на сусло-агаре (7°

\* Чистые культуры любезно предоставлены из коллекций базидиомицетов кафедр ботаники и экологии ЕГУ.

Блг). Колонии гриба растут в виде белых пушистых пленок, с возрастом становятся плотными, бугристыми, обладают грибным ароматом. При глубинном культивировании на жидких средах растут в виде мицелиальных шариков, сохраняя грибной аромат.

**Питательные среды.** 1. Молочная сыворотка. Базидиомицетами молочная сыворотка без предварительной обработки не усваивается, поэтому требуется гидролиз лактозы для получения ассимилируемой грибами глюкозы. С этой целью проводили кислотный гидролиз серной кислотой: кислотность сыворотки доводили до  $pH$  1,8–2,0, помещали в автоклав и гидролизовали в режиме стерилизации при 0,5 атм 30 мин. По окончании гидролиза  $pH$  среды доводили до нужного значения насыщенным раствором  $NaOH$ . Такой способ предварительной обработки молочной сыворотки, предложенный группой авторов [7], позволяет осуществлять глубинное культивирование гриба, не способного утилизировать нативный субстрат. 2. Гидролизат подсолнечной лузги. Подсолнечная лузга высушивалась, измельчалась в порошок, взвешивалась и подвергалась кислотному гидролизу [8]. 1 стадия – гидролиз 2%-ной  $HCl$  в течение 5 часов на кипящей водяной бане с выходом пентозанов. По окончании гидролиза раствор фильтровали, осадок на фильтре, содержащий клетчатку, высушивали и проводили II стадию – гидролиз 72,5%-ной  $H_2SO_4$  в течение 2 часов при 30°C. После этого добавлялась вода, и кипячение проводилось с обратным холодильником в течение 2 часов. Нейтрализацию до нужного значения  $pH$  проводили насыщенным раствором  $NaOH$ . Полученные гидролизаты объединяли, стерилизовали при 0,5 атм 20 мин и использовали в качестве питательной среды. 3. Отвар зеленой массы. 1 кг зеленой массы растений заливали 3 л воды, кипятили 30 мин, настаивали в течение суток, фильтровали и стерилизовали при 0,5 атм 30 мин [1]. 4. Фруктовый отвар. В качестве отхода консервной промышленности использовали грушевый жом, содержащий кожуру, сердцевину и остатки мякоти плодов. Далее отвар получали вышеописанным способом (п. 3). 5. Пивное сусло. Во всех экспериментах пивное неохмеленное сусло использовали в качестве универсальной питательной среды – контроля. Плотность соответствовала содержанию редуцирующих сахаров 3–3,5% (по глюкозе). Ко всем питательным средам (за исключением пивного сусла) добавляли минеральную основу следующего состава (г/л воды):  $(NH_4)_2SO_4$  – 3,0,  $KH_2PO_4$  – 0,6;  $K_2HPO_4$  – 0,4;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5.

В качестве посевного материала (инокулума) использовали поверхностно выращенную пятисуточную культуру на сусло-агаре, которая вносилась в колбы с питательными средами в виде нераздробленной пленки. При таких условиях мицелий рос не гомогенно, а в виде шариков – стром, в которых клетки довольно плотно соприкасаются друг с другом, что характерно, как правило, для глубинного роста культур в ферментерах.

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера на 750 мл на качалке (240 об /мин) при 26°C. Полученную биомассу отделяли от культуральной жидкости (КЖ) через нейлоновую ткань, промывали холодной водой, нарезали на мелкие кусочки и помещали между листами фильтровальной бумаги для удаления излишков влаги. Сырую биомассу растирали в фарфоровой ступке до гомогенного состояния, добавляли 96°-ный этанол (гидромуль 30) и экстрагировали свободные внутриклеточные аминокислоты в пробирках с обратным холодильником 1 час при 80°C. Полученные спирторастворимые экстракты аминокислот использовали для количественного определения последних методом хроматографии распределения на бумаге [9,10], а отдельно для пролина – по Пайзу [11], аминный азот КЖ – микрометодом Хардинга и МакЛина [12], растворимый белок КЖ (РВ) – по методу Лоури с соавторами [13], содержание редуцирующих веществ КЖ (РВ) – микрометодом Хедгорн-Йенсена [9].

**Результаты и обсуждение.** При глубинном росте гриба на испытуемых питательных средах (табл. 1) через 72 часа инкубации максимальная скорость усвоения РВ отмечена на среде с отваром зеленой массы (39%) и молочной сывороткой

(22%); в остальных вариантах она не превышала 20%. По скорости расхода РВ рост культуры на пивном сусле, фруктовом отваре и гидролизате подсолнечной лузги одинаков. Результаты анализа роста гриба в течение первых трех суток показали, что на средах с молочной сывороткой, отваром зеленой массы и (несколько меньше) с гидролизатом подсолнечной лузги активное усвоение низкомолекулярных форм азота совпадало с интенсивной ассимиляцией РВ (табл. 1). Вместе с тем отмеченный в табл. 1 синтез внеклеточного РВ свидетельствует как о благоприятных условиях роста продуцента, так и о возможности активного синтеза щелочных и кислых протеаз (неопубликованные данные).

Таблица 1

Некоторые показатели глубинного роста *Fl. velutipes* на различных питательных средах (мг/100 мл КЖ)\*

Питательные среды	РВ			Аминый азот			РБ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	4
пивное сусло	3000	2400	20	15,5	15,4	0,65	500	712,5	212,5
молочная сыворотка	5000	3900	22	55,3	17,8	67,8	200	356,5	156,5
фруктовый отвар	3100	2500	19	39,0	35,0	10,3	470	1250,0	780,0
отвар зеленой массы	3300	2000	39	52,5	32,0	39,0	500	587,5	87,5
гидролизат подсолнечной лузги	4100	3500	15	35,0	27,0	23,0	500	406,5	–

\* 1 – до инкубации, 2 – через 72 часа инкубации, 3 – потребление (% от исходного содержания), 4 – приращение РВ.

В многочисленных публикациях, затрагивающих закономерности азотного обмена при глубинном культивировании базидиомицетов, как закономерное явление отмечается вариабельность качественного и количественного состава аминокислот в зависимости от фаз роста культуры, состава питательной среды [14,15]. Данные табл. 2 подтверждают это резким изменением количественного содержания свободных внутриклеточных аминокислот в различных фазах роста гриба.

Таблица 2

Количественное содержание спирторастворимых аминокислот *Fl. velutipes* при глубинном культивировании (мкг. аз / 100мг биомассы)

Аминокислоты	Варианты опыта*				
	ПМ	1	2	3	4
цис	следы	следы	следы	следы	следы
лиз-гис	следы	5,622	32,796	16,064	153,143
арг	следы	–	34,722	6,481	117,962
асп	14,760	2,963	7,408	3,704	42,371
сер	0,863	–	0,772	3,087	6,741
гли	1,315	–	2,778	2,778	2,889
глу	следы	3,087	–	12,860	2,675
тре	–	–	–	3,010	4,815
ала	7,895	46,922	26,697	70,990	56,792
тир	следы	следы	–	–	10,833
ГАМК	–	9,524	–	23,810	–
вал-мет	2,403	6,349	3,968	5,953	19,810
фен	4,920	9,151	–	–	–
лей-илей	21,525	25,979	3,161	23,852	–
про	26,250	50,000	40,180	48,750	92,860
сумма	79,931	159,597	152,482	221,339	510,891

\* ПМ – аминокислоты биомассы (АБ) посевного материала (инокулума); 1 – АБ, выращенной на пивном сусле; 2 – АБ – на фруктовом отваре; 3 – АБ – на отваре зеленой массы; 4 – АБ – на гидролизате подсолнечной лузги.

Если в составе свободных внутриклеточных аминокислот посевного материала содержатся следовые количества лиз-гис, арг, глу, тир, очень незначительные количества сер, гли, вал-мет, то в трехсуточном мицелии их концентрация возрастает в несколько раз (в зависимости от среды культивирования – в 2–7 раз). В большей степени это относится к ала, содержание которого в варианте с отваром зеленой массы и пивным суслом доходит до 41–43% от суммы аминокислот соответственно, и к арг в вариантах с фруктовым отваром и гидролизатом подсолнечной лузги. Во всех без исключения вариантах отмечено высокое (по сравнению с концентрацией в инокулуме) содержание про.

Особого внимания заслуживают данные по аминокислотному составу биомассы, выращенной на гидролизате подсолнечной лузги. Имеющиеся литературные данные по осахариванию посредством гидролиза отходов сельского хозяйства – кукурузных кочерыжек, шелухи хлопковых и подсолнечных семян, льняной костры, овсяной мякоти, остатков сахарного тростника после извлечения сахара и др. – свидетельствуют о безусловной перспективности использования дешевых комплексных питательных сред, содержащих как углеводы, так и ассимилируемые грибами различные формы азота и биостимуляторы [1–3]. По нашим данным, существенное обогащение аминокислотного пула в рассматриваемом варианте происходит за счет лиз-гис, арг, асп, ала, тре, вал-мет.

Таким образом, увеличение фонда свободных аминокислот глубинно культивируемой биомассы *Fl. velutipes* свидетельствует о благоприятных условиях роста на фруктовом отваре, а также на отваре зеленой растительной массы и гидролизате подсолнечной лузги. Об этом же свидетельствует и накопление в фонде незаменимых аминокислот лиз, гис, вал, мет, лей, илей.

*Кафедра биохимии, научно-исследовательская лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии*

*Поступила 15.09.1999*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова Думка, 1988.
2. Бясько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубокой культуре. Киев: Наукова Думка, 1983.
3. Соломко Э.Ф. Высший съедобный базидиальный гриб вешенка обыкновенная *Pleurotus ostreatus* (JaCQ: Fr) KUMM как продуцент биомассы пищевого назначения (медико-биологический аспект). Киев, Изд-во Института ботаники им. Н.Г. Холодного, 1988.
4. Таратунина Л.В., Тарасова Н.В., Манаков М.Н., Сайкина Е.В. – Биотехнология, 1987, т.3, № 4, с. 484.
5. Таратунина Л.В., Тарасова Н.В., Манаков М.Н., Неклюдов А.Д., Цыбаев В.В., Ларкин А.М. – Биотехнология, 1988, т. 4, №2, с. 221.
6. Соломко Э.Ф., Аре Р.Ю., Стеганцева Е.М. – Биотехнология, 1988, т. 4, №5, с. 629.
7. А.С. №1244179, 1986.
8. Прескот С., Дэн С. Техническая микробиология. М.: ИЛ, 1952.
9. Белозерский А.Н., Проскураков Н.И. Практическое руководство по биохимии растений. М.: Советская наука, 1951.
10. Lissitzky S., Laurent G. – Bull. Soc. Chim. – Biol., 1955, v. 37, p. 1177.
11. Piez K.A., Irreverre F. – J. Biol. Chem., 1956, v. 223, p. 687.
12. Harding W.Y., MacLean R.M. – JBC, 1916, v. 24, p. 503.
13. Lowry O.H., Rosebrough J., Farr A.L., Randall R.J. – J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
14. Безбородов А.М. Микробиологическая промышленность. М., 1971, вып.2.
15. Рубан Е.Л., Вербина Н.М., Бутенко С.А., Озолянь Р.К., Заринь Д.Г. Биосинтез аминокислот микроорганизмами. М.: Наука, 1968.

FLAMMULINA VELUTIPES ՄՆԿԻ ԱԶԱՏ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԿԱԶՄԸ  
ՄՆՆԴԱՅԻՆ ԱՐԴՅՈՒՆԱՐԵՐՈՒԹՅԱՆ ԹԱՓՈՆՆԵՐԻ ՎՐԱ ԽՈՐՔԱՅԻՆ  
ԱՃԵՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրված են բազիդյալ սնկի՝ *Flammulina velutipes*-ի խորքային աճի առանձնահատկությունները աննդամիջավայրերում, որոնք պարունակում են որպես աննդաարյունաբերության թափոններ՝ կաթնաշիճուկը, պտուղների մզուքը, բուսական եփուկները, արևածաղկի ունդակեղևի հիդրոլիզատը: Փորձերը ցույց են տվել, որ կուլտուրայի աճման ընթացքում էական փոփոխությունների ենթարկվել են սնկամարմնի սպիրտում լուծելի ամինաթթուները: Երեք օրվա սնկամարմնում կտրուկ նվազում է ասպ-ի պարունակությունը և մեծանում է լիզ, գիս, ալգ, թիրոզ և հատկապես՝ ալա, գլու, վալ, մեթ ամինաթթուների քանակությունը: Ամփոխարինելի ամինաթթուների՝ լիզ-ի, լեյ-ի և մեթ-ի զգալի ավելացումը աննդամիջավայրերի զնահատման դրական ցուցանիշ է հանդիսանում: