

БИОМАССА BLAKESLEA TRISPORA – ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЙ ИСТОЧНИК БИОСИНТЕЗА КАРОТИНА

Л.В. Кричковская

Україна, НТУ “Харківський політехнічний інститут”, м. Харків

Проведено вивчення в лабораторних умовах впливу антиоксидантів 2,6-дитрет-бутил-4-метіл-фенолу (БОТ), прооксидантів (KMnO₄ та перекису водню в концентрації 0,01%) на каротиногенез та рівень біомаси мукорового гриба Blakeslea trispora. Доведено, що введення в культуру прооксиданту KMnO₄ збільшує вихід каротину.

Культивирование клеток микроорганизмов, синтезирующих биологически активные вещества, представляет большой интерес как источник абсолютно экологически чистых продуктов вторичного метаболизма, которые можно применять в медицине, парфюмерии, пищевой промышленности. К таким продуктам относится каротин из списка культур, крупномасштабное выращивание которых имеет коммерческий успех, невелик, что объясняется высокой себестоимостью процесса. Однако, учитывая экологическое состояние почвы, воды и воздуха, процесс получения экологически чистых, биологически активных веществ на основе микробиологических продуцентов является наиболее перспективным.

К таким продуктам относится каротин, являющийся продуктом метаболизма микробиологического гриба Blakeslea trispora, крупномасштабное производство которого было налажено на Украине на Верхнеднепровском крахмально-паточном комбинате.

Целью работы было увеличение выхода каротина при культивировании микроскопического гриба *Blakeslea trispora* путем регулирования состава среды, на которой производилось выращивание его биомассы.

Глубинное культивирование в лабораторных условиях проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл питательной стерильной среды следующего состава (г/л): глюкозы – 60,0; мочевины – 2,0; магния сульфата – 0,5; натрия хлорида – 0,5; калия фосфата однозамещенного – 1,0; дрожжевого экстракта – 0,5; железа сульфата двухвалентного – 0,01; рН среды 6,3-6,8. Растворы глюкозы и мочевины готовили отдельно, стерилизовали в автоклаве и вносили в среду. При посеве колбы засеивали 7-10-суточной культурой, выращенной на агаризованной среде Ср-1. Для этого в пробирки вносили по 5-6 мл простерилизованной дистиллированной воды, пипеткой суспендировали мицелий и споры и переносили инокулят-суспензию в колбы с жидкой питательной стерильной средой из расчета: содержание 1 пробирки на 100 мл среды. Колбы помещали на ротационную качалку со скоростью вращения 180-190 об./мин. Температура культивирования 26-28°C. Время выращивания – 3 суток.

Используемая в качестве продуцента каротиноидов культура микроскопического мукорового гриба относится к непатогенным микроорганизмам, его биомасса нетоксична для теплокровных животных. Этот микроорганизм быстро развивается на синтетических питательных средах, содержащих органические источники азота и различные углеводы (мальтозу, глюкозу и др.) рН среды 6,3-6,8.

При культивировании *Blakeslea trispora* в выделенном каротине идентифицированы четыре фитостерола: ситостерин, стигмастерин, стигмастенол и кампестерин.

Таблица 1

Содержание изомеров стеаринов каротина, % от общего

Общее содержание, %	Кампестерин	β -ситостерин	Стигмастерин	Δ^2 стигмастенол
0,289 \pm 0,001	9,30 \pm 0,005	71,98 \pm 0,03	8,91 \pm 0,005	9,07 \pm 0,007
$S_x=0,003$	$S_x=0,015$	$S_x=0,084$	$S_x=0,014$	$S_x=0,018$
E=1,1%	E=1,6%	E=1,2%	E=1,5%	E=1,0%

Основная доля фитостеринов (около 58% общего содержания) находится в свободном состоянии, остальная часть – в виде монозидов. Содержание фитостеринов колебалось при разных условиях культивирования в пределах 3-5%.

В качестве косвенного доказательства стабильности синтеза каротиноида и стеаринов культивируемыми клетками *Blakeslea trispora* была рассчитана оценка математического ожидания количественного содержания каротина в биомассе при различных условиях культивирования. Изменения условий культивирования состояли в использовании в среде выращивания гриба разных добавок (витаминов, увеличение освещения, разные начальные рН среды и т.д.). Содержание стеаринов определяли методом тонкослойной хроматографии и ГЖК. Идентификация проводилась по стандартному раствору холестерина, относительному времени удерживания и путем сравнения с известными данными.

В результате проведения серий экспериментов было рассчитано, что математическая оценка ожидания содержания каротиноидов в биомассе *Blakeslea trispora* при различающихся условиях культивирования равна 369,5 мг/г, коэффициент вариаций 30%. Следовательно, даже значительные изменения условий культивирования *Blakeslea trispora* не приводит к радикальным изменениям содержания каротиноидов в биомассе мукорового гриба *Blakeslea trispora*.

Учитывая антиоксидантное действие каротиноидов на ненасыщенные липиды, было решено, что изменение окислительных условий в среде выращивания может регулировать их синтез, так как антиоксиданты влияют на функционирование физико-химической системы регуляции клеточного метаболизма.

Изменение окислительных условий в среде культивирования может быть достигнуто повышением как аэрации, так и внесением в среду прооксидантов, предположительно стимулирующих каротиногенез в клетках растущей культуры. Известен целый ряд соединений, добавление которых стимулирует каротиногенез у микроорганизмов, но внесение

этих соединений в культуральную среду удорожает процесс выращивания и получение конечного продукта. Кроме того, при добавлении таких соединений в среду культивирования они могут накапливаться в биомассе и в процессе экстрагирования переходить в конечный продукт, придавая им токсические свойства.

В работе для стимуляции каротиногенеза у «V.t.» были испытаны достаточно дешевые и доступные прооксиданты: перекись водорода (0,01%) и перманганат калия (0,01%), а также повышение аэрации вдвое.

Результаты проведенных экспериментов показали, что при повышении аэрации в 2 раза рост гриба усиливался в 1,7 раза, а уровень липоидов во столько же раз снижался. Содержание каротиноидов в липоидах повышалось почти на 40% (табл.2).

Однократное добавление перекиси водорода в концентрации 0,01% от объема среды также стимулировало рост культуры, однако снижало выход липидов, содержание каротиноидов в липидах увеличивалось, но в меньшей степени, чем в варианте с повышенной аэрацией.

Таблица 2

Влияние антиоксидантов и прооксидантов на выход биомассы, липидов и синтез каротиноидов

Среда культивирования	Выход биомассы, г/л	Выход липидов, % от сухой биомассы	Содержание каротиноидов, мг%
1.+БОТ 0,02%	7,5±0,1	28,65±1,19	285,8±18,7
2.Аэрация в 2 раза	8,4±0,2*	13,26±1,12*	484,4±15,6*
3.+Перекись водорода 0,01%	7,0±0,1	19,41±1,11	420,3±14,4
4.+KMnO ₄ 0,01%	4,8±0,1	22,51±1,22	496,4±17,6*
5.Контроль	5,0±0,1	22,25±1,18	342,1±16,5

*P<0,05

Заметно усиливался каротиногенез (45%) при однократном внесении перманганата калия в концентрации 0,01% от объема среды через 5-6 часов после посева культуры. При этом выход биомассы был сравним с контрольным.

С учетом стимулирующего влияния на каротиногенез перманганата калия нами были испытаны разные концентрации данного прооксиданта, а также сроки его введения в среду (табл.3).

Таблица 3

Влияние разных концентраций KMnO₄ на рост гриба *Blakesla trispora*, синтез биомассы и каротиноидов

Кратность добавки KMnO ₄ в сутки	Биомасса, г/л	Липиды, % от сухой биомассы	Каротиноиды, мг%
1.1x0,01%	7,8±0,1	14,31±1,22	457,2±21,3
2.1 x 0,02%	4,8±0,1	14,8±1,21	465,5±19,7
3.3 x 0,01%	6,2±0,1	19,37±1,19	548,9±20,6*
4.3x0,02%	4,4±0,1	13,3±1,20	481,2±20,8*
5.Контроль	5,2±0,1	14,4±1,17	328,8±17,2

* p < 0,05

Результаты проведенных экспериментов показывают, что во всех опытных вариантах добавление перманганата калия в среду стимулировало синтез каротиноидов, содержание которых было заметно выше, чем в контроле. Так, в варианте с трехкратным добавлением перманганата калия в концентрации 0,01% от объема среды наблюдалось самое высокое содержание каротиноидов (1,7 раза) и липидов (1,3 раза).

Внесение в среду антиоксиданта БОТ снижает содержание каротиноидов в липидах, вызывая усиление роста биомассы.

Выводы.

Добавление прооксидантов и повышение аэрации стимулировало синтез каротиноидов, которые являются внутренними антиоксидантами, что приводит к снижению окисляемости липидов. Максимальное содержание каротиноидов в липидах достигалось при трехкратном дробном добавлении через каждые 24 часа в среду культивирования перманганата калия в концентрации по 0,01% от объема среды.