

УДК 582.281.212:579.66:57.083.132

И.М. ЗУБАРЕВА, Н.Б. МИТИНА, Я.В. БАБИЧ

ИЗУЧЕНИЕ ИОНОНОВ КАК СТИМУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ *BLAKESLEA TRISPORA*

ГВУЗ „Украинский государственный химико-технологический университет”, г. Днепропетровск

Изучено влияние стимулирующего действия α -, β -ионов и их смеси на процессы каротиногенеза и накопления биомассы у мукорового гриба – продуцента β -каротина.

Биотехнологическое производство, в том числе и микробиологическое производство бета-каротина, может быть рентабельным только при условии сверхсинтеза целевого продукта, в данном случае, бета-каротина.

Промышленное получение бета-каротина основано на использовании мукорового гетероталлического гриба *Blakeslea trispora*, биосинтетические процессы у которого необходимо стимулировать.

Повышение активности метаболических путей в клетках гриба достигается различными способами: оптимизацией качественного и количественного состава питательной среды, оптимизацией внешних условий культивирования. Но наиболее эффективным способом интенсификации производства, в целом, является применение специальных стимуляторов каротиногенеза, что обеспечивает значительное увеличение выхода целевого продукта без дополнительных затрат сырья и энергии.

Промышленное получение бета-каротина основано на использовании мукорового гетероталлического гриба *Blakeslea trispora*, биосинтетические процессы у которого необходимо стимулировать.

В качестве стимуляторов каротиногенеза у *Blakeslea trispora* изучены различные природные и синтетические соединения, их смеси, микробные массы различного происхождения, отходы цитрусовых культур и др. [1]. Наибольшее влияние на синтез каротиноидов смешанной культурой гриба *Blakeslea trispora* оказывает бета-фактор – половой гормон гриба. Выход бета-каротина в присутствии бета-фактора (триспоровой кислоты) возрастает в 20–25 раз [2].

Получать триспоровые кислоты в чистом виде затруднительно, поскольку синтезируются они в клетках гриба в очень низких концентрациях. Следовательно, введение такого вещества, как индивидуального препарата технологически сложно и экономически не выгодно. Поэтому применение

бета-фактора в промышленном производстве на сегодняшний день не возможно.

Обнаружены различные синтетические аналоги триспоровых кислот, наиболее эффективным среди которых оказался бета-ионон.

На сложных маслосодержащих средах присутствие этого биостимулятора увеличивает выход бета-каротина в 3–4 раза по сравнению с контролем. Механизм действия бета-ионона сводится к стимуляции ферментов, участвующих в биосинтезе каротиноидов. Механизм срабатывает на уровне трансляции белков на рибосомах. Причем, в молекулу бета-каротина бета-ионон не включается. Это означает, что бета-ионон выступает стимулятором каротиногенеза, но не является предшественником каротиноидов.

Таким образом, поиск стимуляторов каротиногенеза бета-иононного ряда является актуальным. Как потенциальные стимуляторы могут рассматриваться различные производные ионов. Так, имеются довольно противоречивые сведения о стимулирующих действиях альфа-ионона [3]. Различия в химической структуре альфа- и бета-ионов заключается только в положении двойной связи в циклической части молекулы (рис. 1).

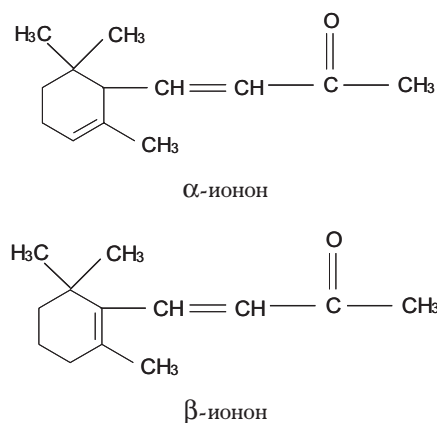


Рис. 1. Структурные формулы химических изомеров ионов

В данной работе изучено влияние альфа- и бета-ионов на развитие смешанных культур гриба *Blakeslea trispora* в условиях глубинного периодического культивирования. Поэтому, возможно предположить наличие стимулирующих каротинообразования свойств так же и у альфа-иона. В связи с этим, целью данной работы является сравнительное изучение влияния альфа-и бета-ионов на развитие смешанных культур гриба *Blakeslea trispora* в условиях глубинного периодического культивирования.

Для проведения исследований использовали смешанную культуру мукового гриба *Blakeslea trispora*, представленного (+) 64 и (-) 490 штаммами. Посевной материал получали пересевом обеих форм с музейных косяков на рабочие, содержащие сусло-агаровую питательную среду. Оптимальный срок выращивания рабочей культуры 7 суток. В течение двух последних суток рабочая культура гриба освещалась солнечным светом с целью усиления спорообразования. Последующий пересев посевного материала гриба проводился на жидкую кукурузно-соевую питательную среду в качалочные колбы объемом 250 мл. Продолжительность раздельного культивирования гриба в маточных колбах на качалках 3 суток, режим перемешивания 220–240 об./мин.

Совместное выращивание обеих форм продуцента (ферментация) проводили в колбах вместимостью 250–300 мл на качалках, работающих со скоростью 220–240 об./мин. в течение 5 суток. Ферментационная среда имеет следующий состав: кукурузная мука – 4,7%; соевая мука – 2,3%; дигидрофосфат калия – 0,05%; тиамин гидрохлорид – 0,0002%. Кукурузная и соевая мука предварительно поддавались слабокислотному гидролизу. Температура культивирования на всех стадиях 24–26°C. Питательные среды стерилизовали в автоклаве. Режим тепловой обработки 1,25 атм в течение 45 мин [4,5].

Стимуляторы каротиногенеза вносили в культуральную жидкость на стадии ферментации смешанной культуры гриба в концентрациях от 50 до 2500 мкг/мл, предварительно растворив их в растительном масле. Время внесения стимуляторов 48 ч от начала ферментации. Выход биомассы и бета-каротина определяли по известным методикам [6]. Опыты выполняли в 10 повторностях. Полученные результаты, обработанные методом математической статистики [7], представлены графически. Зависимость выхода бета-каротина от концентрации стимуляторов приведена на рис. 2.

Зависимость выхода биомассы гриба от концентрации стимуляторов приведена на рис. 3.

По мере повышения концентраций бета-иона от 50 мкг/мл до 500 мкг/мл количество бета-каротина интенсивно увеличивается, о чем свидетельствует характер кривой выхода бета-каротина. Дальнейшее увеличение количества бета-иона в

культуральной жидкости (от 500 мкг/мл до 1500 мкг/мл) не обеспечивает еще большей активации каротиногенеза грибом, и кривая располагается параллельно оси абсцисс. Еще большее количество иона (от 1500 до 2500) угнетают процесс синтеза каротиноидов у *Blakeslea trispora*. Активность культуры по каротину довольно резко снижается и при концентрации 2500 мкг бета-иона в мл культуральной жидкости (КЖ), достигает 53 мг бета-каротина в 100 мл КЖ, то есть выход бета-каротина снижается практически в 2 раза.

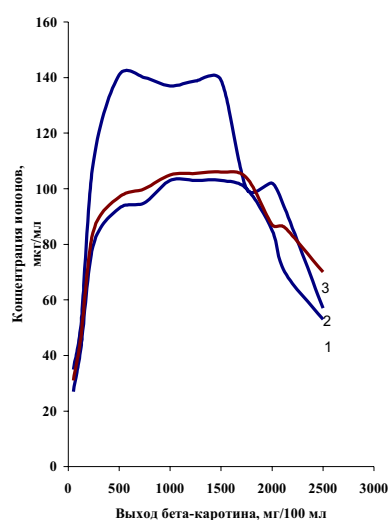


Рис. 2. Зависимость выхода бета-каротина от концентрации ионовых стимуляторов: 1 – концентрация альфа-ионов; 2 – концентрация бета-ионов; 3 – концентрация смеси альфа- и бета-ионов

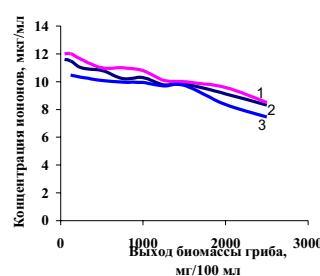


Рис. 3. Зависимость выхода биомассы гриба от концентрации стимуляторов: 1 – концентрация альфа-ионов; 2 – концентрация бета-ионов; 3 – концентрация смеси альфа- и бета-ионов

Таким образом, выход бета-каротина, в присутствии 500–1500 мкг бета-ионов в 1мл КЖ, увеличивается в 4,5 раза, по сравнению с контролем. В контрольные среды бета-ион не вносился.

Действие изомерного вещества альфа-иона подобно стимулирующему влиянию бета-иона. Кривая выхода бета-каротина от концентрации

альфа-иона подобна зависимости накопления бета-каротина от концентрации бета-иона. Вероятно, механизмы активирующего действия исследуемых ионовых веществ сходны между собой. Структурное отличие альфа- и бета-ионов заключается только в положении двойной углерод-углеродной связи в циклогексановом кольце ионов, что не оказывает влияние на способность стимулировать каротинообразование у гриба-продуцента.

Значительно более эффективным оказалось комбинированное действие альфа- и бета-ионов на биосинтетическую активность продуцента. Выявлена общая закономерность действия смеси ионовых веществ и каждого из них по отдельности. Характеры приведенных кривых подобны и различаются только количественно. Так, смесь равных концентраций альфа- и бета-ионов увеличивает выход бета-каротина в 1,4 раза по сравнению с одним альфа-ионом или бета-ионом. Большой стимулирующий эффект смеси ионовых веществ, вероятно, объясняется синергическим действием их на каротиногенные структуры и системы *Blakeslea trispora*.

Обратное влияние оказывает присутствие стимуляторов на ростовые процессы у исследуемого продуцента бета-каротина. Так, и альфа- и бета-ионы подавляют накопление биомассы грибом. При постепенном увеличении концентрации бета-иона (до 1500 мкг/мл) в КЖ количество биомассы также постепенно снижается и составляет чуть более 80% по сравнению с контролем, когда стимулятор не вносится в культуральную среду. Дальнейшее возрастание количества бета-иона увеличивает скорость ингибирования мицелиальной массы *Blakeslea trispora*. При концентрации бета-иона 2500 мкг/мл накопление биомассы снижается почти в 1,4 раза относительно контроля.

Кривые влияния альфа-иона и смеси обоих изомеров на рост гриба проходят параллельно охарактеризованной кривой для бета-иона. Но в присутствии альфа-иона абсолютное значение биомассы продуцента несколько ниже, чем в присутствии бета-иона в среде культивирования. Совместное действие смеси ионовых веществ на накопление биомассы имеет наибольшее ингибирующее действие.

Таким образом, подтверждено стимулирующее действие альфа-иона на процесс каротиногенеза у *Blakeslea trispora*. Это означает, что структурные различия в молекулах альфа- и бета-ионов не влияют на способность их активизировать биосинтетические процессы в клетках продуцента. Наибольшее действие выявили смеси обоих ионовых веществ в концентрации от 500 до 1500 мкг/мл. Следовательно, необходим поиск доступных источников ионовых веществ. При этом нет необходимости разделять изомеры на отдельные фракции. Однако, мицелий продуцента негативно реагирует на присутствие каждого ионного вещества в отдельности. Совместное же присутствие обоих ионов имеет наиболее отрицательное влияние на рост гриба. Но, поскольку активировать каротинообразующие системы *Blakeslea trispora* необходимо, то следует снизить негативное действие ионов на биомассу гриба. Например, определить и оптимизировать время введения ионовых стимуляторов в КЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. — СПб.: Наука, 1995. — 600 с.
2. Регуляция каротиногенеза гриба *Blakeslea trispora* α - и β -ионами / Васильченко С.А., Тригуб И.Д., Фадеев Г.Н., Бровко Л.И., Светкин Ю.В. // Вопр. химии и хим. технологии. — 1985. — Вып.79. — С.3-5.
3. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. Регуляция синтеза ликопина у мокрового гриба *Blakeslea trispora* производными пиридина // Микробиология. — 1995. — Т.64. — № 6. — С.734-740.
4. Разработка питательной среды для выращивания гриба — продуцента β -каротина / В.М. Санникова, В.Д. Погуляка, Ф.Л. Санников, П.Г. Тюпа // Биотехнология. — 1989. — Т.5. — № 1. — С.58-60.
5. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. — М.: МГУ, 1983. — 256 с.
6. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. Экспресс — метод определения содержания ликопина и β -каротина // Микробиология. — 1994. — Т.63. — № 6. — С.1111-1116.
7. Математичне моделювання та оптимізація об'єктів технології неорганічних речовин / Л.А. Фролова, Б.І. Мельников, Ю.Д. Галівець, Н.Б. Мітіна. — Дніпропетровськ: Жур. фонд, 2010. — 208 с.

Поступила в редакцию 06.02.2012