

ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛИХ МЕТАБОЛІТІВ ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA*

ДВНЗ „Український державний хіміко-технологічний університет” м. Дніпропетровськ

Виявлено склад кислих метаболітів у культуральній рідині гриба, які утворюються при культивуванні міцелію на цукровмісних поживних середовищах. Вивчено вплив даних речовин на процеси росту та каротиногенезу продуцента каротиноїдів.

Муковий гетероталічний гриб *Blakeslea trispora*, визнаний в якості промислового продуцента каротиноїдів, виявився вимогливим до складу поживних середовищ [1,2]. У зв'язку з цим, як засівні (+), (-) культури, так і ферментаційну культуру вирощують на складних багатокомпонентних поживних середовищах. В якості основного субстрату поживні середовища містять полі-, оліго-, або моносахариди, основною структурною одиницею яких являється глюкоза. Але наявність глюкози в середовищі вмикає механізм катаболічної репресії, що приводить до пригнічення каротиноутворюючої здатності у продуцента [3].

Відомо, що в процесі утилізації глюкози та цукровмісних субстратів грибом-продуцентом утворюються та накопичуються в культуральній рідині (КР), так звані кислі метаболіти, а саме: деякі органічні кислоти [4]. Вплив цих речовин на зростання та каротиногенез гриба не вивчено. Тому поставлена в даній роботі проблема є актуальною.

Метою даної роботи є виявлення складу кислих метаболітів у культуральній рідині гриба та вивчення їх впливу на ростові та каротиноутворюючі здатності *Blakeslea trispora*.

Виробничі (+), (-) штами продуценту вирощували постадійно. Поверхневу робочу культуру, пересіяну з музейної культури, вирощували роздільно в пробірках на сусло-агаровому поживному середовищі при 26°C протягом 7 діб.

Маточну культуру вирощували також роздільно в колбах об'ємом 300 мл. Склад маточного поживного середовища: кукурудзяний екстракт — 13%, зелена патока — 7%. Тривалість вирощування — 46 год. Ферментацію здійснювали в колбах такого ж об'єму. Склад ферментаційного синтетичного поживного середовища: NH_4OH в розрахунках на NH_3 — 0,1%, H_3PO_4 — 0,5%, тіамінхлорид — $2 \cdot 10^{-4}\%$, джерело вуглецевого живлення, вода дистильована. За мірою асиміляції аміаку виконувалося підживлення середовища його розчином. Джерелом вуглецевого живлення у контролі слугувала зелена патока, яка є компонентом виробничих поживних середовищ. У досліді в якості

джерела вуглецю використовували органічні кислоти: оцтову, піровиноградну. Тривалість ферментації становила 5–7 діб. Для вирощування маточної та ферментаційної культур застосовували мікробіологічну качалку, що працює в режимі 240 об./хв при температурі 28°C.

У ході ферментації відбирали проби культуральної рідини і визначали в них вміст біомаси, бета-каротину та органічних кислот за відомими методиками [5,6,7].

Ефект катаболічної репресії проявляють катаболіти глюкози [3], які накопичуються в культуральній рідині в результаті асиміляції глюкози грибом. Так, синтетичне поживне середовище, яке містить сіль амонію і різні вуглеводи, за мірою накопичення біомаси, закислюється. Крива титрування підкисленого поживного середовища аміаком свідчить, що зниження рН середовища в ході ферментації спостерігається не тільки в результаті асиміляції аміаку, а насамперед, завдяки накопиченню в ньому кислих метаболітів. Серед таких метаболітів виявлені піровиноградна (ПВК), молочна, яблучна та лимонна кислоти. В найбільшій кількості, в умовах даного експерименту, накопичується ПВК, в середньому 10 мг/100 мл, що перевищує кількість інших органічних кислот в 3–5 раз (таблиця). Максимум пірватату утворюється на 15 – 20 годину від початку культивування гриба.

Зміна концентрацій кислих метаболітів у культуральній рідині продуцента

Тривалість культивування, доба	Концентрація кислих метаболітів, мг/100 мл			
	Піровиноградна	Молочна	Яблучна	Лимонна
0	0	0	0	0
1	10	2	0,4	0,1
2	4	3,5	0,9	0,4
3	3	1	2	0,9
4	2	0,3	0,9	1,8
5	2	–	0,05	1,1
6	2	–	–	0,9

Вивчено вплив різних концентрацій ПВК на зростання і каротиногенез продуцента на синтетичному поживному середовищі. Кількість пірувату змінювали від 0 до 1%. Виявлено, що піровиноградна кислота сприяє синтезу каротину. При зростанні концентрацій ПВК від 0 до 0,4%, кількість каротину збільшується, в середньому, у 4 рази. Подальше підвищення концентрації пірувату, до 1%, майже не інтенсифікує утворення каротиноїдів. Позитивний вплив пірувату на процес каротиногенезу пояснюється здатністю його перетворюватися в ацетил-КоА — активовану форму оцтової кислоти, яка є вихідною сполукою синтезу каротиноїдів.

Але, наявність ПВК у культуральній рідині пригнічує накопичення біомаси гриба-продуцента. Найбільший негативний вплив на зростання *Blakeslea trispora* виявляє піруват в кількості 0,4%, кількість біомаси знижується при цьому в 1,7 раз. Подальше збільшення концентрації піровиноградної кислоти до 1%, майже не впливає на стан міцеліальної маси продуцента. Інгибування ростових процесів піруватом пояснюється, ймовірно, збільшенням іонної сили розчину і, отже, зниженням інтенсивності масопередачі по кисню. Про це свідчить той факт, що зменшення обсягу культуральної рідини в качалочній колбі призводить до збільшення біомаси.

При вивченні впливу різних кількостей ПВК на зростання і каротиногенез продуценту при культивуванні його на комплексних поживних середовищах, що містять кукурудзяний екстракт, зелену патоку і рослинну олію було встановлено, що в цих умовах, як правило, піруват не впливає на інтенсивність зростання і каротиногенезу *Blakeslea trispora*.

Відомо, що деякі представники мукорових грибів, які також продукують каротиноїди, але не є промисловими продуцентами, наприклад, *Rhizopus blakesleanus*, здатні зростати і утворювати пігменти на поживних середовищах з оцтовою кислотою. Цікаво, що процеси зростання і каротиногенезу відбуваються у даного мікроорганізму одночасно [8], тобто в цих умовах катаболітної репресії каротиногенезу не відбувається. Для *Blakeslea trispora* використання ацетату в якості поживної речовини невідомо. Тому у даній роботі досліджено можливість зростання і каротиногенезу у продуцента у присутності оцтової кислоти. При вивченні здатності досліджуваного продуцента рости і синтезувати каротин на живильному середовищі з оцтовою кислотою нами враховувалося, що дана речовина здатна перетворюватися мікроорганізмами в ацетил — КоА, який є вихідним мономером в схемі каротиногенезу. Оцтову кислоту вносили у поживне середовище у вигляді ацетату амонію в кількості 1,8 мас.%. Вихід біомаси, в даних умовах, не перевищував 190 мг/100 мл. Зростання припиняється у зв'язку з залуженням

поживного середовища. Це свідчить про те, що середовища, що містять тільки ацетат амонію, не збалансовані за вуглецем і азотом. Накопичення в культуральній рідині невикористаного грибом NH_3 призводить до збільшення рН, а саме: до значення 8,2. Внаслідок цього і спостерігається загибель продуцента. Внесення в поживне середовище в якості додаткового джерела вуглецю рослинного мастила (1–10%) призводить до підвищення рН і значного збільшення біомаси, а саме: до 2200 мг/100 мл. Але каротиноїди в цих умовах практично не синтезуються, накопичений міцелій не має забарвлення. Додавання до поживного середовища, що містить ацетат амонію, олії кукурудзяної і глюкози (1–5%) призводить до помітного посилення як зростання, так і каротиногенезу у продуцента. Біомаси утворюється до 4200 мг/100 мл, β -каротину — до 10 мг/100 мл, при цьому рН знижується і досягає області нейтральних значень. Виявлено, що на вивчених поживних середовищах з ацетатом лаг-фаза (фаза-адаптації гриба) дуже тривала. Так, протягом першої доби культивування зростання міцелію практично не відбувається, що може бути пов'язано з високою концентрацією в середовищі ацетату.

Вплив оцтової кислоти на розвиток продуцента перевіряли також і на комплексному поживному середовищі, до складу якого входять кукурудзяний екстракт, зелена патока і рослинна олія. Ацетат вводився в таке середовище в різних концентраціях: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 і 2 мас.%. При більш високих концентраціях ацетату і накопичення біомаси, і синтез каротину пригнічуються. На синтетичних поживних середовищах, що містять глюкозу, рослинну олію і різні кількості ацетату амонію, зростання продуцента пригнічується ацетатом при його концентрації більше 0,3–0,4 мас.%.

Враховуючи, що високі концентрації оцтової кислоти інгибують зростання і каротиногенез досліджуваного продуцента, у даній роботі запропоновано спосіб його культивування на синтетичних живильних середовищах з підживленням ацетатом амонію. У такому випадку поживна речовина вноситься порціями, що забезпечує вміст оцтової кислоти в середовищі на рівні 0,2–0,3%. При цьому способом культивування вихід біомаси досягає 5200 мг/100 мл, а β -каротину — 15 мг/100 мл. На синтетичних живильних середовищах з ацетатом амонію вивчалися різні цукри: глюкоза, мальтоза, сахароза, лактоза, маніт, інозит, дульцит, сорбіт, рамноза, арабіноза. Вказані вуглеводи обрані не випадково, вони входять до складу зеленої патоки, яка використовується в якості основного субстрату в промислових поживних середовищах. Максимальний вихід біомаси та бета-каротину спостерігався на середовищі з глюкозою. Отже, оцтова кислота асимілюється продуцентом бета-каротину виду *Blakeslea trispora*. Однак, інтенсивність зростання і каротиногенезу незначна. Низькі кон-

центрації ацетату амонію на комплексних поживних середовищах не впливають на його зростання і каротиноутворення. Високі концентрації пригнічують ці процеси. На синтетичних живильних середовищах, що містять різні концентрації ацетату амонію і різні вуглеводи зростання і каротиногенез гриба значно слабкіший, ніж на комплексних поживних середовищах.

Таким чином, у даній роботі досліджені деякі кислі метаболіти *Blakeslea trispora*. Виявлена здатність продуцента асимілювати певні органічні кислоти як джерела вуглецевого живлення. Встановлено, що піровиноградна кислота збільшує вихід бета-каротину, в середньому, в 4 рази на середовищах, що містять в якості єдиного джерела азотного харчування амоній. Тому можливо використовувати піруват у промисловості в якості стимулятора каротиногенезу на поживних середовищах, що містять діамоній фосфат. Оцтова кислота у великих концентраціях інгібує зростання і каротиногенез *Blakeslea trispora*. Однак культивування гриба на синтетичних поживних середовищах з порційним підживленням ацетатом амонію збільшує вихід біомаси та бета-каротину, до 5200 мг/100 мл і 15 мг/100 мл відповідно.

Отримані результати можуть бути використані для оптимізації поживних середовищ у виробництві мікробіологічного бета-каротину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Билай В.И.* Основы общей микологии. — К.: Вища шк., 1980. — 360 с.
2. *Васильченко С.А., Зубарева И.М., Федорова И.С.* Влияние питательных сред на рост и каротиногенез *Blakeslea trispora* // Микробиологический журн. — 1993. — Т.55. — № 4 — С.31-36.
3. *Dholakia G.* Fermentative production of β -carotene and extracellular b-glucosidase by *Blakeslea trispora* on cellulose // *Europ.g Appl.Microbiol and Biotechnol.* — 1982. — Vol.15. — № 1 — P.33-35.
4. *Зубарева И.М., Кузнецова О.В.* Влияние отдельных органических кислот на метаболизм каротинсинтезирующего гриба *Blakeslea trispora* // Вісник ДНУ. Сер. Біологія. Екологія — 2001. — Т.9. — № 1 — С.184-186.
5. *Асатиани В.С.* Ферментативные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — 740 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. *Методы экспериментальной микологии.* Справочник / *Дудка И.А., Васильченко С.П., Эланская И.А.* и др.; Отв.ред. В.И. Билай. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
8. *Friedl I., Goodwin T.W., Griffith L.A.* Studies in carotenogenesis // *Biochem. I.* — 1955. — Vol.60. — № 4. — P.649-655.

Надійшла до редакції 25.06.2012