

## ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ КАК СТИМУЛЯТОРОВ КАРОТИНОГЕНЕЗА У ГРИБА *BLAKESLEA TRISPOGA*

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

Изучено каротинстимулирующее действия различных растительных масел в процессе культивирования гриба *Blakeslea trispora*. Оптимизирован состав ферментационной питательной среды для данного продуцента по липидному компоненту.

Синтез каротиноидов у промышленного продуцента *Blakeslea trispora* значительно интенсифицируется в присутствии липидных компонентов в питательной среде [1,2]. Данная зависимость характерна как для сложных комплексных, так и для питательных синтетических сред [3].

В микробиологической промышленности в качестве липидного компонента питательных сред используют жиры растительного или животного происхождения. Так, в промышленном производстве бета-каротина применяют растительные масла, которые выполняют и другие дополнительные функции, а именно: пеногашение, дополнительный источник углерода и энергии для гриба-продуцента.

Дополнительные функции обеспечиваются внесением различных растительных и животных жиров в питательные среды [4,5]. Уровень же стимуляции каротинообразования, вероятно, зависит от природы растительного масла и от его жирнокислотного состава. Свойства различных растительных масел, как стимуляторов каротиногенеза у промышленного продуцента бета-каротина мукорового гриба *Blakeslea trispora* не изучены, а значит, не определены оптимальные липидные компоненты питательных сред, обеспечивающие усиленный синтез каротиноидов у гриба.

Целью данной работы является изучение каротинстимулирующего действия различных растительных масел и выбор оптимального липидного компонента ферментационной питательной среды для культивирования продуцента *Blakeslea trispora*.

Мукоровый гетероталлический гриб *Blakeslea trispora* выращивают поэтапно. Первоначально раздельным пересевом (+) и (-) музейных косячков на сусло-агаровую питательную среду, получали рабочие (+), (-) культуры; поверхностное выращивание длилось 7 суток при температуре 24–26°C. При этом 5 суток пробирки выдерживали в темноте, а последние двое суток – на свету для усиления спорообразования у продуцента. Последующий пересев проводили также раздельно на

жидкие питательные среды в маточные колбы объемом 300 мл. Состав маточных питательных сред следующий (%): кукурузный экстракт – 13, зеленая патока – 7. Время выращивания маточной культуры на микробиологических качалках, работающих со скоростью 220–240 об./мин составляет трое суток при 26°C. Полученный (+), (-) посевной материал переносили для совместного выращивания в ферментационные колбы объемом 300 мл. Соотношение (+), (-) штаммов для совместного культивирования составляет 4:1. Состав ферментационных сред следующий (%): кукурузный экстракт – 6, зеленая патока – 6, дигидрофосфат калия – 0,05, тиамин хлорид – 0,0002, растительное масло – остальное. В экспериментальные питательные среды вносили различные растительные масла в неодинаковых концентрациях. Контрольная среда растительного масла не содержала. Продолжительность ферментации составила 5 суток при 26°C на микробиологической качалке, работающей с указанным выше режимом перемешивания.

Стимулирующее действие масел проверяли как на комплексных, так и на синтетических средах, в состав которых входят:  $\text{NH}_4\text{OH}$  в расчете на  $\text{NH}_3$  – 0,1%,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 0,5%, тиаминхлорид –  $2 \cdot 10^{-4}\%$ , зеленая патока – 6%, вода дистиллированная – остальное. По мере ассимиляции аммиака проводилась подпитка питательной среды его раствором. По окончании ферментации полученную культуральную жидкость (КЖ) сепарировали методом центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге типа Т – 23. Культуральную жидкость анализировали по содержанию биомассы и бета-каротина по известным методикам [3,6]. Опыт проводили в 3–5 повторностях. Полученные результаты обрабатывали с помощью методов математической статистики [7].

В данной работе изучено стимулирующее действие ряда растительных масел: кукурузного, оливкового, подсолнечного, хлопкового, льняного, соевого, рапсового, кунжутного, горчичного,

как наиболее распространенных и применяемых, в том числе и в качестве пеногасящих компонентов в микробиологических производствах. Все исследуемые масла вносили в ферментационную питательную среду в концентрации 4%. Выбор концентрации липидного компонента в питательной среде основан на анализе некоторых предыдущих работ [1,2,8,9]. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1  
Влияние некоторых растительных масел на развитие гриба *Blakeslea trispora*

Липидный компонент среды (растительное масло), %	Содержание в культуральной жидкости	
	Биомассы, г/л	Бета-каротина, г/л
Льняное	60,75±2,40	0,9530±0,0060
Соевое	52,70±2,08	0,8230±0,0050
Подсолнечное	48,60±1,92	0,7620±0,0050
Кунжутное	41,60±1,60	0,6350±0,0040
Кукурузное	41,50±1,60	0,6350±0,0040
Хлопковое	39,90±1,56	0,5830±0,0040
Рапсовое	38,90±1,10	0,4500±0,0030
Горчичное	35,50±0,80	0,3109±0,0020
Оливковое	35,30±0,75	0,2500±0,0008
Контроль	30,90±0,58	0,1700±0,0007

Данные табл. 1 свидетельствуют, что все изученные растительные масла стимулировали как накопление биомассы, так и бета-каротина у продуцента. Но степень положительного влияния их различна. Так, наиболее сильное действие, по сравнению с контролем, и на рост, и на каротинообразование гриба оказывает льняное масло. Количество биомассы достигает 60,75 г/л, а выход бета-каротина – 0,953 г/л, что в два раза превышает значение по биомассе и в девять раз – по количеству бета-каротина в контрольных пробах. Несколько ниже уровень стимулирующего влияния соевого, подсолнечного, кунжутного, кукурузного масел по сравнению с льняным маслом. Присутствие в питательной среде рапсового масла обеспечивает более низкий выход биомассы (в 1,5 раза), выход же бета-каротина в два раза ниже, чем в присутствии льняного масла. Положительное действие горчичного и оливкового масел на рост и каротинообразование гриба еще слабее.

Различия в стимулирующем действии различных растительных масел, вероятно, объясняется их жирнокислотным составом, а именно: содержанием и соотношением в них насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Так, наибольшее количество полиненасыщенных кислот (омега-3 и омега-6) отмечено в составе льняного масла, в среднем до 69%, несколько меньше данного компонента в соевом масле – до 58%, в подсолнечном – до 56%, в кунжутном – до 46%, в куку-

рузном – до 45%, в хлопковом – до 44%, в рапсовом – до 31%, в горчичном – до 24%, в оливковом – до 8% [10]. Уровень стимулирующего действия изученных масел соответствует процентному содержанию в них ненасыщенных жирных кислот.

Полученные и приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют, что природа используемого растительного масла в большей степени влияет на уровень каротинообразования, чем на выход биомассы у *Blakeslea trispora*. Вследствие этого изучено влияние различных концентраций липидного компонента питательной среды на процесс каротиногенеза у продуцента. Для данного эксперимента выбраны масла кукурузное и подсолнечное. Предпочтение указанных масел объясняется тем, что в нашем регионе наиболее распространенными из ряда исследованных масел являются подсолнечное и кукурузное масла, которые обладают высоким стимулирующим действием на развитие продуцента. Использование льняного масла, оказывающего наибольшее стимулирующее действие на развитие продуцента, экономически не выгодно из-за его высокой стоимости и дефицитности. Стимулирующее действие кукурузного и подсолнечного масел изучено в широких пределах концентраций от 3% до 25%. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2  
Влияние различных концентраций кукурузного и подсолнечного масел на каротиногенез продуцента

Содержание кукурузного масла, %	Выход бета-каротина, г/л	Содержание подсолнечного масла, %	Выход бета-каротина, г/л
3	0,55±0,027	3	0,64±0,030
4	0,65±0,030	4	0,79±0,037
12	0,88±0,044	12	1,03±0,051
20	0,93±0,047	20	1,09±0,055
25	0,78±0,037	25	0,91±0,046

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что при повышении количества как кукурузного, так и подсолнечного масла от 3% до 20% в составе питательной среды, выход бета-каротина увеличивается. На подсолнечном масле накопление каротина выше, чем на кукурузном, в среднем, в 1,1 раза. В обоих случаях липидный компонент вносили в питательную среду порциями до 6%, по мере его ассимиляции грибом. При одномоментном внесении всего количества масла в среду вязкость питательного раствора возрастала, что резко ухудшало массообменные процессы в нем и вело к гибели клеток продуцента. При концентрации масла в среде 25% накопление каротина снижается, что также объясняется ухудшением массообмена в питательной среде и, возможно, образующимся избытком углерода, что

также подавляет развитие гриба.

Для оптимизации состава питательных сред по липидному компоненту предлагается использовать двух- или трехкомпонентные масляные смеси. Соотношение масел в смеси основано на содержании в них полиненасыщенных жирных кислот из семейства 6 (омега-6) и из семейства 3 (омега-3), которое должно быть 10:1 соответственно [10]. Примеры двухкомпонентных масляных смесей: подсолнечное и соевое масла; соевое и кукурузное масла; подсолнечное и льняное масла. Предлагаемая трехкомпонентная масляная смесь содержит подсолнечное, соевое и кукурузное масла с указанным соотношением омега-6 и омега-3 ненасыщенных жирных кислот.

В данной работе проверено также стимулирующее влияние растительных масел на развитие гриба и на синтетических питательных средах. Масло вносили в среду в концентрации от 2% до 8%. Обнаружено, что количество мицелиальной биомассы на синтетических питательных средах увеличивается до 20 г/л, что практически в 10 раз больше, чем на синтетической среде без добавки масла. Это объясняется тем, что растительные масла являются дополнительным источником углерода в питательной среде, в данных условиях. Но каротин при этом практически не синтезируется, и мицелий остается непигментированным.

Дополнительное внесение в питательную среду, содержащую масло, глюкозы (от 1% до 5%), приводило к значительному усилению роста и каротиногенеза у гриба. Так, количество биомассы достигает 40 г/л, а бета-каротина – до 0,1 г/л.

Таким образом, в данной работе изучено стимулирующее действие некоторых растительных масел. Выявлено, что уровень стимулирующего влияния исследованных масел соответствует процентному содержанию в них полиненасыщенных жирных кислот. Наибольшее положительное действие на развитие продуцента бета-каротина *Blakeslea trispora* оказывает льняное масло. Также достаточно высокими стимулирующими свойствами обладают соевое, подсолнечное и кукурузное масла. Подсолнечное и кукурузное – более распространенные в нашем регионе, имеют приемлемую стоимость, а значит более доступны для промышленного применения, чем льняное и соевое масла. Изучено влияние различных концентраций этих масел на рост и каротиногенез гриба как на комплексных, так и на синтетических пи-

тательных средах. Установлено, что стимулирующее действие масел значительно ниже на синтетических средах, чем на комплексных. Присутствие же в сложной ферментационной питательной среде одного из указанных масел в концентрации от 4% до 20%, при условии их дробного внесения, обеспечивает повышенный уровень каротинообразования у продуцента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Липолитическая* активность гриба *Blakeslea trispora* / Васильченко С.А., Баталкина Л.В., Василенко Е.В., Берников Н.И., Светкин Ю.В. // Вопр. химии и хим. технологии. – 1989. – Вып.91. – С.49-52.
2. Зубарева И.М., Митина Н.Б., Кириченко Е.С. Изучение липазной активности *Blakeslea trispora*-продуцента бета-каротина // Вопр. химии и хим. технологии. – 2012. – № 1. – С.32-35.
3. 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.
4. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с.
5. Пат. 1814660 СССР, МКИ<sup>3</sup> С 12 Р 23/00 С 12 N 1/14 Способ получения б-каротина / Васильченко С.А., Никитин Г.А., Кунщикова И.С. и др. (СССР). – № 4921496113; Заявл. 25.03.91; Опубл. 07.05.93. Бюл. № 17. – 4 с.
6. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. Эуспресс-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.
8. *Экзолипазная* активность гриба *Blakeslea trispora* / С.А. Васильченко, Л.В. Баталкина, Е.В. Василенко, Ю.В. Светкин // Ферментативная и спиртовая промышленность. – 1987. – № 1. – С.32-34.
9. Васильченко С.А., Шкляр Г.Д. О стимуляции каротиногенезной активности *Blakeslea trispora* растительными маслами // VII Съезд Украинского микробиологического общества: Тез. докл. Респ. съезда. – Киев. –1989. – С.107.
10. Тутельян В.А., Нечаев А.П., Кочеткова А.А. Функциональные продукты в структуре питания // Масложировая промышленность. – 2009. – № 6. – С.6-9.

Поступила в редакцию 15.10.2012