

И.М. Зубарева, Н.Б. Митина

ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА РАЗВИТИЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA*

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

Изучено каротинстимулирующее действие различных жирных кислот на процессы роста и каротинообразования гриба *Blakeslea trispora*, а также оптимизирован жирно-кислотный состав ферментационной питательной среды для данного продуцента.

Актуальность каротиноидных препаратов в настоящее время возрастает, поскольку каротиноиды привлекают внимание специалистов различных сфер деятельности человека: медиков, биологов, пищевиков, животноводов. Объясняется такая ситуация широким распространением каротинов в природе и многообразием выполняемых ими физиологических функций [1]. Наибольшую ценность среди множества природных каротиноидов представляет бета-каротин, обеспечивающий животный организм двумя молекулами жирорастворимого витамина А, в отличие от других каротиновых веществ.

Промышленное производство бета-каротина основано на периодическом культивировании смешанной культуры (+) и (-) форм мукорового гетероталлического гриба *Blakeslea trispora*. Ферментационные питательные среды содержат смесь основных и вспомогательных субстратов: источники углерода и энергии, азота, фосфора, макро- и микроэлементов. Кроме того, в посевных и ферментационных средах присутствует такой дополнительный компонент, как растительное масло, выполняющий в составе питательных сред несколько функций: пеногашение, дополнительный источник углерода и энергии, а также источник жирных кислот, которые оказывают влияние на развитие продуцента [2,3].

Некоторые авторы отмечают, что в присутствии растительного масла в питательной среде интенсифицируется синтез каротиноидов у промышленного продуцента [3,4]. Причем, интенсивность роста и каротиногенеза гриба в значительной степени определяется природой используемого растительного масла и его жирнокислотным составом [5,6].

В ряде работ показано также, что наиболее положительное действие на каротинообразование у продуцента имеет кукурузное масло в количестве около 4% [7,8]. Известно, что в процессе

развития гриба масло подвергается гидролизу соответствующими ферментами экзоплазми [3,4,9]. Продуктами липолиза масла являются различные жирные кислоты, оказывающие разностороннее влияние на развитие продуцента [5,10,11].

Но, количественные характеристики влияния жирнокислотного состава масел на скорость роста и накопления биомассы бета-каротина у *Blakeslea trispora* мало изучены, а значит, не определен оптимальный качественный и количественный жирнокислотный состав ферментационных питательных сред, способных обеспечить усиленный синтез каротиноидов грибом.

Целью данной работы является изучение влияния некоторых продуктов гидролиза (липолиза) кукурузного масла (пальмитиновой, олеиновой, стеариновой, линолевой, линоленовой кислот) на рост и каротиногенез гриба-продуцента *Blakeslea trispora*.

Выращивание мукорового гетероталлического гриба *Blakeslea trispora* проводили по-стадийно. Первоначально получали рабочую (+), (-) культуру. Для этого проводили отдельный пересев (+) и (-) музейных косячков на сусло-агаровую питательную среду. Поверхностное выращивание рабочей культуры 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 отдельно на жидкие питательные среды в маточные колбы объемом 300 мл. Состав маточных питательных сред следующий (%): кукурузный экстракт – 13, зеленая патока – 7, остальное вода. Время выращивания маточной культуры составляет трое суток при 26°C на микробиологических качалках, работающих со скоростью 220–240 об./мин. Полученный (+), (-) маточный 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 – 4, остальное вода. В экспериментальные питательные среды вносили некоторые свободные жирные кислоты в различных концентрациях. Контрольная среда жирных кислот не содержала. Все используемые питательные среды подвергали термической стерилизации при 120°C в течение 45 мин.

Продолжительность ферментации составляла 5 суток при 26°C на микробиологической качалке, работающей в указанном выше режиме перемешивания. По окончании ферментации полученную культуральную жидкость (КЖ) сепарировали методом центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге Т – 23. Культуральную жидкость анализировали по содержанию биомассы и бета-каротина по известным методикам [4,12]. Опыт проводили в 3–5 повторах. Полученные результаты обрабатывали с помощью методов математической статистики [13].

В данной работе изучено влияние таких свободных жирных кислот, как: пальмитиновая, олеиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая, которые в неодинаковых концентрациях обнаруживаются в составе самых различных растительных масел, в том числе и в составе кукурузного масла. Все исследуемые жирные кислоты вносили в ферментационную питательную среду в одинаковой начальной концентрации 0,5%. Выбор концентрации исследуемого жирового компонента в питательной среде, содержащей 4% кукурузного масла, основан на анализе некоторых предыдущих работ [3–5,8]. Содержание растительного масла в среде также выбрано в соответствии с некоторыми ранними работами [6–8,9], в которых показано, что при указанной концентрации субстратного лимитирования по маслу не наблюдается. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что все изученные свободные жирные кислоты стимулировали как накопление биомассы, так и бета-каротина у продуцента. Но степень их положительного влияния различна. Так, наиболее сильное действие, по сравнению с контролем 1, на рост и на каротинообразование гриба оказывает линолевая жирная кислота. Количество биомассы достигает 45,17 г/л, а выход бета-каротина – 0,768 г/л, что в 1,48 раза превышает значение по биомассе и в 4,5 раза – по количеству бета-каротина в контрольных пробах 1. По сравнению с контролем 2 свободная линолевая жирная кислота также увеличивает показатели процесса: выход биомассы гриба повышается на 9%, выход бета-каротина – на 17%. Несколько ниже уровень положительно-

го действия других изученных жирных кислот: пальмитиновой, олеиновой, стеариновой, линоленовой. Так, относительно первых контрольных проб свободная пальмитиновая жирная кислота повышает накопление мицелиальной массы гриба в 1,5 раза; олеиновая – в 1,43 раза; стеариновая – в 1,6 раза и линоленовая – в 1,4 раза. Выход биомассы в присутствии указанных жирных кислот увеличивается также и по сравнению со вторым контролем – на 12, 5, 17 и 2% соответственно. Следовательно, в наибольшей степени накопление биомассы продуцента стимулируют стеариновая и пальмитиновая жирные кислоты.

Таблица 1

Влияние некоторых свободных жирных кислот на развитие гриба *Blakeslea trispora*

Жирные кислоты в составе питательной среды, %	Содержание в культуральной жидкости	
	Биомассы, г/л	Бета-каротина, г/л
Пальмитиновая	46,10±1,38	0,630±0,0150
Олеиновая	43,30±1,30	0,736±0,0100
Стеариновая	47,73±1,43	0,650±0,0160
Линолевая	45,17±1,37	0,768±0,0190
Линоленовая	41,95±1,23	0,705±0,0180
Контроль 1	29,93±0,58	0,169±0,0008
Контроль 2	40,99±1,18	0,640±0,0007

Примечание: контроль 1 – питательные среды не содержат ни растительного масла, ни жирных кислот; контроль 2 – питательные среды содержат 4% растительного масла, но не содержат жирных кислот.

При внесении в питательные среды исследуемых жирных кислот уровень каротиногенеза у продуцента изменяется следующим образом. Как отмечалось выше, наибольший выход каротина обеспечивает присутствие в питательной среде линолевой кислоты относительно двух видов контроля. Внесение же пальмитиновой кислоты увеличивает каротинообразование в 3,7 раза по сравнению с первым контролем, а добавление олеиновой, стеариновой и линолевой – в 4,4; 3,8 и 4,2 раза соответственно. По сравнению со вторым контролем все изученные жирные кислоты проявляют более слабое стимулирующее действие на биосинтетическую активность гриба, что объясняется присутствием в кукурузном масле 45% собственных ненасыщенных жирных кислот [3,6]. Так, добавление пальмитиновой кислоты даже снижает выход каротина на 2%, присутствие в среде культивирования свободных олеиновой, стеариновой и линолевой кислот повышает каротинообразование продуцента на 15, 1,6 и 10% соответственно. Таким образом, среди всех изученных жирных кислот наибольшее каротинстимулирующее действие на *Blakeslea trispora* оказывают линолевая, олеиновая и линоленовая кислоты,

как в присутствии растительного масла в среде, так и без него. Пальмитиновая же и стеариновая жирные кислоты в питательной среде стимулируют накопление биомассы продуцента. Различия в стимулирующем действии различных изученных жирных кислот, вероятно, объясняется их отношением к насыщенным и ненасыщенным жирным кислотам.

Поскольку свободная линолевая кислота проявила наибольшее положительное действие на развитие гриба-продуцента, то изучено влияние ее различных концентраций в составе питательной среды на интенсивность роста и каротиногенеза у *Blakeslea trispora*. В питательную среду вносили от 0,5 до 4% данного вещества. Выбор исследуемых концентраций линолевой кислоты в среде, содержащей 4% кукурузного масла, основан на анализе некоторых ранних работ [6,14,15]. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние различных концентраций линолевой кислоты на интенсивность роста и каротиногенеза продуцента

Содержание линолевой кислоты, %	Выход биомассы, г/л	Выход бета-каротина, г/л
0,5	45,17±1,37	0,771±0,0254
1	45,88±1,84	0,819±0,0270
2	46,95±1,92	0,864±0,0285
3	48,75±1,95	0,928±0,0306
4	47,15±1,89	0,960±0,0336
Контроль	41,39±1,48	0,650±0,0215

Примечание: контроль - питательные среды содержат 4% растительного масла, но не содержат жирных кислот.

Данные, приведенные в табл. 2, подтверждают, что при увеличении концентрации линолевой кислоты в ферментационной питательной среде от 0,5 до 4% повышается выход как каротина, так и биомассы гриба-продуцента. Причем, каротинсинтезирующая способность *Blakeslea trispora* усиливается на 20–50% соответственно количеству внесенной линолевой жирной кислоты. Стимулирующее влияние исследуемого компонента на накопление мицелиальной массы продуцента ниже, чем на выход каротина. При введении в питательную среду от 0,5 до 3% линолевой кислоты выход биомассы увеличивается практически на 10–19%. Присутствие 4%-ной концентрации данной жирной кислоты в среде уже угнетает образование биомассы гриба и количество ее на 5% ниже, чем при 3%-ной концентрации линолевой кислоты в среде. Очевидно что, оптимальное количество свободной линолевой кислоты в ферментационной питательной среде, содержащей 4% кукурузного масла, составляет не более 3%. Такое соотношение жировых компонентов в среде обеспечивает выход и биомассы, и каротина у проду-

цента, что особенно актуально при производстве каротинсодержащей биомассы *Blakeslea trispora*.

Таким образом, в данной работе изучено стимулирующее действие некоторых свободных жирных кислот на развитие гриба *Blakeslea trispora*. Показано, что все изученные свободные жирные кислоты стимулировали как накопление биомассы, так и бета-каротина у продуцента. Но степень их положительного влияния различна. Насыщенные кислоты увеличивают накопление биомассы, а на каротиногенез влияют слабее. Ненасыщенные жирные кислоты, наоборот, интенсифицируют, в основном, каротиногенез продуцента. Наибольшее положительное действие из исследованных ненасыщенных жирных кислот на развитие гриба-продуцента оказывает линолевая кислота при концентрации не более 3% в составе ферментационной питательной среды, содержащей 4% кукурузного масла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб.: Наука, 1995. – 600 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. 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.
4. 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.
5. Васильченко С.А., Шкляр Г.Д. О стимуляции каротиногенезной активности *Blakeslea trispora* растительными маслами // У11 Съезд Украинского микробиологического общества: Тез. докл. Респ. съезда. – Киев. – 1989. – С.107.
6. Васильченко С.А., Шкляр Г.Д. Стимуляция каротиногенеза у *Blakeslea trispora* свободными жирными кислотами // Биотехнология получения кормового белка, экологически чистых продуктов, повышающих урожайность, премиксов, ферментов и витаминов кормового назначения: Тез. докл. Респ. конф. – 1990. – С.121-122.
7. Пат. 1814660 СССР, МКИ³ 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.
8. Васильченко С.А., Шкляр Г.Д., Орехов В.С. Влияние состава растительных масел на каротиногенез гриба *Blakeslea trispora* / Днепропетровский химико-технологический институт.- Днепропетровск, 1991. – 25 с. – Деп. в НПО Медбиоэкономика 14.03.91, № 553-мб-91.
9. Экзолипазная активность гриба *Blakeslea trispora* / С.А. Васильченко, Л.В. Баталина, Е.В. Василенко,

Ю.В. Светкин // Ферментативная и спиртовая промышленность. – 1987. – № 1. – С.32-34.

10. *Вплив лінолевої та ліноленової кислот на біомасу маточної культури каротинсинтезуючого грибу Blakeslea trispora* / І.С. Федорова, І.М. Зубарева, О.М. Лебедева, Н.П. Величко // Хімія і сучасні технології: Тез. доп. 111 Міжнар. науково-технічної конф. студентів, аспірантів та молодих вчених – Дніпропетровськ. – 2007. – С.249.

11. *Влияние линолевой и линоленовой кислот на процесс каротиногенеза у гетероталлического муковорого гриба Blakeslea trispora* / И.С. Федорова, И.М. Зубарева, О.Н. Лебедева, Н.П. Величко // Хімія і сучасні технології: Тез. доп. 111 Межнар. науково-технічної конф. студентів, аспірантів та молодих вчених. – Дніпропетровськ – 2007. – С.250

12. *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.

13. *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.

14. *Тутельян В.А., Нечаев А.П., Кочеткова А.А.* Функциональные продукты в структуре питания // Масложивая промышленность. – 2009. – № 6. – С.6-9.

15. *Васильченко С.А., Дрюк Л.Ф., Лебедева О.Н.* Определение жирно кислотного состава жиров и масел газохроматографическим методом // Вопр. химии и хим. технологии. – 1988. – Вып.88. – С.37-40.

Поступила в редакцию 13.12.2012