

УДК 602.3:582.282.23+664.641.15

ШТАМОСПЕЦИФІЧНІСТЬ СЕЛЕКЦІОНОВАНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA* ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ У СЕРЕДОВИЩАХ ІЗ КУКУРУДЗЯНИМ БОРОШНОМ

С. В. Гураль

g_svitlana@ukr.net

Інститут біології тварин НААН

У промисловій біотехнології дріжджів пріоритетними є взаємопов'язані етапи, а саме отримання штаму-продуцента і активація його генетичного потенціалу за оптимальних умов культивування (аерації, температури) та складу середовища. Використовуючи ступінчасту позитивну селекцію дріжджів *Phaffia rhodozyma*, проведено кілька циклів мутагенезу культури клітин на різних селективних середовищах. Скринінг клітин після мутагенезу був недостатнім, тому, ймовірно, слід перевіряти чутливість/стійкість мутантів до інгібіторів, прекурсорів, індукторів для підвищення вибірки колоній із покращеним біосинтезом каротиноїдів. Крім того, мутанти досить часто більш чутливі за дикий штам до селективних сполук. З'ясування механізмів біосинтезу каротиноїдів як вторинних метаболітів у дріжджів *P. Rhodozyma* допоможе регулювати цей процес за бажаними цільовими продуктами.

Дріжджі *P. rhodozyma* культивували у рідкому середовищі складу (г/л): KH_2PO_4 — 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,9; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; дріжджовий екстракт — 2; глюкоза — 20. За необхідністю у рідке середовище додавали по 20 г/л агару та кукурудзяного борошна, а також гліцерол. Біомасу дріжджів нарощували в колбах Ерленмейера (заповнення колб 10 %) на шейкері (200 об/хв) за температури 20 °С. Інокулятом була дводобова культура дріжджів, вирощених у рідкому середовищі сталого складу.

Кукурудзяне борошно, ймовірно, містить прекурсори чи індуктори каротиноїдів — сполуки, які можуть використовуватися у їх біосинтезі і змінювати метаболічні шляхи у каротиносинтезуючих дріжджів. Кукурудзяне борошно містить 2,1 г харчових волокон, а також мікроелементи (292 мг калію, 104 мг магнію, 301 мг фосфору, 46 мг кальцію, 4,1 мг заліза, 4 мг цинку, 0,3 мг марганцю, 1,03 мг міді, 2,4 мг кобальту) та вітаміни (0,32 мг провітаміну А, 0,38 мг В1, 0,14 мг В2, 2,10 мг РР та 10 мг Е). Культивування селекціонованих штамів з різною пігментацією колоній на агарі з борошном кукурудзи за різних джерел Карбону в тотожній кількості (глюкози чи гліцеролу) сприяє росту селекціонованих штамів, однак певні відмінності у пігментації клітин найбільше виражені для коричнево пігментованого мутанта. Як позитивний контроль використовували середовище із сушлом, оскільки відомо, що воно збагачене вітамінами, а відповідно ростові характеристики мутантів найкращі. Певні відмінності у пігментації клітин та рості мутантів виявляють їх штамоспецифічність. Дикий штам NRRLY-17268 дріжджів *P. rhodozyma* суттєво змінює пігментацію клітину середовищі із кукурудзяним борошном та гліцеролом порівняно до середовищ з глюкозою. Штам *KHГ1*, ймовірно, з посиленням синтезом астаксантину, був менш яскравим за насиченням у присутності гліцеролу як основного джерела Карбону. Можливо це пов'язано з погіршенням росту та послабленням каротиногенезу внаслідок відсутності ростових факторів, зокрема вітамінів. Штам *М3* з посиленням ростовими властивостями лише на середовищі із гліцеролом був значно світлішої пігментації колоній, ніж контроль. Тобто зміна біосинтезу каротиноїдів не порушує приріст біомаси цього штаму, що вигідно з точки зору біотехнологічних перспектив метаболізму дріжджів. Для штаму *III.3.brownz* коричневою пігментацією клітин забарвлення змінювалося до світло рожевого, тобто ставало подібнішим до дикого штаму на дослідних середовищах. Ми спостерігали пригнічення приросту біомаси у клітин штамів *I.1.pink* і *III.3.brownz* послідовності: контроль > кукурудзяне борошно-глюкоза > кукурудзяне борошно-гліцерол, тоді як на сушло-агарі приріст біомаси був найоптимальнішим. Штами *I.1.pink* та *III.3.brownz* потребують певного компоненту у середовищі культивування за яким вони можуть бути дефіцитними. Він може бути наявним у суслі, або ж цей продукт утворюється в результаті метаболізму в штамі. Каротин-продукуючі штами *B.UV* та *24G.UV*, з різним співвідношенням каротину та інших каротиноїдів у біомасі, змінюють пігментацію клітин у середовищі із кукурудзяним борошном та гліцеролом, ймовірно, за рахунок зміненого шляху метаболічних процесів. Оскільки гліцерол належить до повільно-метаболічних речовин доцільніше використовувати його як додаткове джерело Карбону. Безколірний штам *G.UV* проявляє відтінкову відмінність у зовнішньому вигляді колоній на дослідних середовищах, що цікаво з точки зору більш детального вивчення зміни шляхів біосинтезу каротиноїдів у дріжджів *P. rhodozyma*.

Збільшення концентрації кукурудзяного борошна (20 г/л, 30 г/л та 40 г/л) у рідкому середовищі сталого складу для культивування дріжджів *P. Rhodozyma* без дріжджового екстракту з різними джерелами Карбону (глюкози чи 0,2 М гліцеролу) знижує приріст та відповідно каротиногенезу штаму *KHГ1*, ймовірно за рахунок перебудови шляхів метаболізму та залучення амілазних систем для асиміляції цукрів з кукурудзяного борошна. Висушену біомасу можна використовувати як кормову добавку в раціоні тварин після проведення додаткових досліджень цього біотехнологічного продукту. Додавання водного фільтрату кукурудзяного борошна менш ефективне для приросту біомаси дріжджів, ніж саме кукурудзяне борошно. За відсутності дріжджового екстракту відбувається зниження росту клітин практично у 3–4 рази порівняно з контролем незалежно від часу культивування. Щодо каротинопродукуючих властивостей штамів на цих дослідних середовищах, то підтверджується факт, що каротиноїди — вторинні метаболіти у дріжджів *P. rhodozyma*, тому пригнічення росту супроводжується зниженням і каротиногенезу.

Отже, кукурудзяне борошно можна використовувати як додатковий компонент у середовищах культивування дріжджів *P. Rhodozyma* як каротиновмісної добавки до раціону тварин.