

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ β -КАРОТИНА ДРОЖЖАМИ *RHODOTORULA GRACILIS*–YS-03

Автор: Елена КИРИЦА

Технический Университет Молдовы

Абстракт. Актуальной задачей современной биотехнологии остается получение биологически активных соединений, синтезируемых микроорганизмами. Из продуктов микробного синтеза особый интерес представляют – каротиноиды, потребность в которых продолжает возрастать, что требует расширения потенциальных источников их получения. Особое внимание уделяется биотехнологическим способам получения β -каротина, являющимся провитамином А, который играет важную, неопределимую роль для протекания нормальных физиологических процессов человеческого организма.

Ключевые слова: пигменты, каротиноиды, β -каротин, биосинтез.

Введение

В современной биотехнологии очевидна целесообразность поиска таких добавок к питательным средам, которые позволят одновременно регулировать рост и синтез отдельных компонентов клеток дрожжей. Зная биохимические пути биосинтеза того или иного продукта, можно значительно улучшить процесс биосинтеза путем добавления в питательную среду для выращивания микроорганизмов предшественников получаемого продукта, ингибиторов или стимуляторов отдельных звеньев данного процесса [1, 2]. Важную роль в процессе биосинтеза каротиноидов играют органические кислоты, входящие в состав трикарбонового цикла, к которым относятся трикарбоновые кислоты – лимонная, цисаконитовая, изолимонная, щавелевоянтарная и дикарбоновые кислоты - яблочная, янтарная, кетоглутаровая, фумаровая и щавелевоуксусная [5]. Клетки получают из цикла трикарбоновых кислот значительные количества оксалоацетата, α -кетоглутарата и сукцинил СоА, используемых для синтеза клеточных компонентов. В настоящее время для получения каротиноидов микробиологическим путем в заводской практике используются различные стимуляторы: β -ионон и его более дешевые заменители (1,6,6-триметил-1-ацетилциклогексен, лимонен, цитрусовая пульпа или цитрусовое масло, ретинол, некоторые ароматические соединения (диметилфталаты, вератрол) и ряд гетероциклических соединений (изониазид, ипрониазид)) [2, 6]. Согласно данным литературы, индукторы синтеза каротиноидов делятся на 3 группы: триспоровые кислоты; соединения, содержащие β -иононовое кольцо, и фенилпроизводные, из которых в практике используют диметилфталат и вератрол. Исходя из того, что механизм действия этих соединений неизвестен, но существенные различия в их химическом строении и, в тоже время одинаковая способность усиливать синтез каротиноидов, позволяют предположить, что синтез каротиноидов интенсифицируется при действии неблагоприятных факторов среды [3, 5]. Так, на средах, содержащих кукурузную и соевую муку, подсолнечное масло и β -ионон, можно увеличить выход β -каротина до 3 г/л среды, однако недостатком производства является дороговизна среды выращивания.

В связи с этим, перспективным является возможность удешевления питательной среды для культивирования дрожжей путем использования в качестве предшественников индукторов процесса каротиногенеза ацетат натрия, ацетат цинка и лимонная кислота, а в качестве стимуляторов данного процесса растительных масел: кукурузного, подсолнечного, соевого, оливкового масел и ретинола.

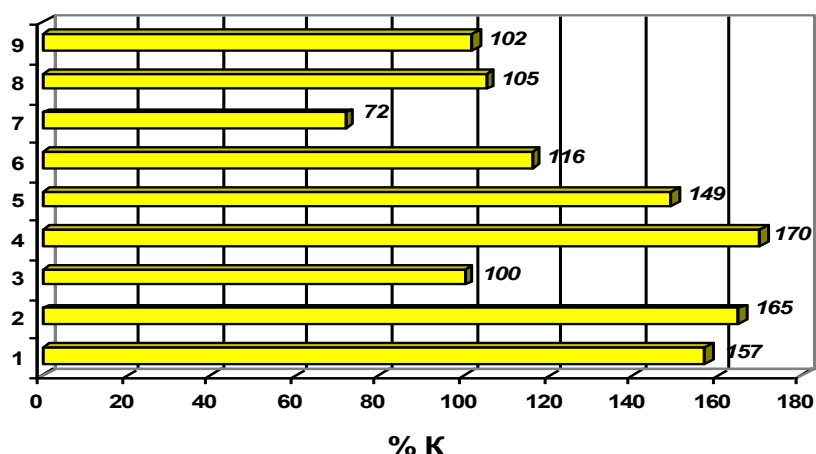
Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм дрожжей *Rhodotorula gracilis*–YS-03 из Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Республики Молдова. Дрожжи культивировали на жидкой питательной среде глубинным способом [4] с использованием в составе среды предшественников процесса каротиногенеза - (NaCH_3COO -1,0; 3,0; 5,0 г/л, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ -1,0; 3,0; 5,0 г/л, $(\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ -0,005; 0,010; 0,015 г/л) и стимуляторов кукурузного, подсолнечного, соевого, оливкового масел и ретинола, концентрацией 1,0 г/л. Условия культивирования: +25..+27°C, pH – 5,5-6,5, на качалке при 180-200 об/мин., освещение 12-15 тысяч эрг/см² в течении 5 суток. Идентификация пигментов проводилась методом спектрофотометрического анализа [7].

Результаты и обсуждение

В результате исследований было установлено, что продуктивность дрожжей зависит от того, какой предшественник и в каком количестве добавлен в основную среду культивирования.

Анализ проведенных исследований показал, что биосинтез пигмента β -каротина, зависит от природы используемого вещества и его количества в питательной среде. Биосинтез β -каротина дрожжами *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 происходит наиболее активно при внесении в питательную среду предшественников – ацетата натрия (3,0 г/л) или лимонной кислоты (1,0 г/л), которые оказывают значительное стимулирующее действие на данный процесс (рис.4). При этом содержание β -каротина увеличивается на 57 и 70% соответственно по сравнению с контролем, что составляет 329,69 и 357,46 мкг/г с.в. Эффективность действия данных предшественников, вероятно, обусловлена их участием в процессе метаболизма микроорганизмов и, в частности, в процессе дыхания и биосинтеза каротиноидных пигментов.

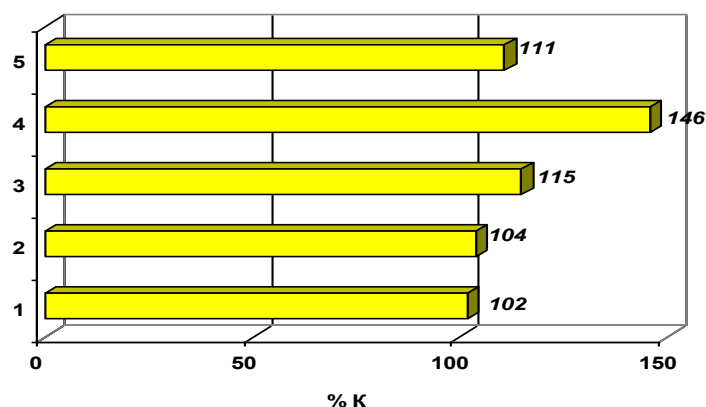


1- NaCH_3COO (1,0 г/л); 2- NaCH_3COO (3,0 г/л); 3 - NaCH_3COO (5,0 г/л); 4 - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (1,0 г/л); 5 - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (3,0 г/л); 6 - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (5,0 г/л); 7 - $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (0.005 г/л); 8 - $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (0.010 г/л); 9- $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (0.015 г/л)

Рис 1. Влияние предшественников каротиногенеза на содержание β -каротина биомассе дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS – 03

Культивирование дрожжей на среде, в состав которой входит ацетат цинка позволяет увеличить содержание β -каротина в биомассе лишь на 5 % по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствует о малоэффективном действии последнего на биосинтез каротиноидов, что вероятно, связано с наличием в его составе цинка, основной функцией которого является стабилизация клеточных структур. Лимонная кислота, как представитель цикла трикарбоновых кислот, согласно полученным результатам оказывает наилучшее стимулирующее действие на процесс биосинтеза β -каротина при выращивании дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS – 03 на питательной среде с содержанием лимонной кислоты концентрацией 1,0 г/л, что позволяет увеличить содержание данного пигмента на 70% по сравнению с контролем.

Результаты исследования изменения биосинтеза β -каротина в биомассе дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS–03 в присутствии индукторов представлены на рисунке 2.



1 - 1,0 г/л подсолнечного масла; 2 -1,0 г/л соевого масла; 3 -1,0 г/л оливкового масла; 4 -1,0 г/л кукурузного масла; 5 -1,0 г/л ретинола

Рис. 2. Влияние индукторов каротиногенеза на содержание β - каротина в биомассе дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS – 03

Полученные результаты исследований позволили констатировать, что биосинтез главного пигмента дрожжей - β- каротина происходит наиболее активно при наличии в питательной среде кукурузного масла, обладающего способностью увеличивать его содержание в 1 г сухой биомассы дрожжей до 329,310 мкг/г с.в., что на 46 % больше по сравнению с контролем. Наличие в среде культивирования оливкового масла и ретинола также способствовало увеличению биосинтеза данного пигмента, но только в меньшей степени - на 15 и 11 %, соответственно по отношению к контролю.

Стимулирующее действие кукурузного масла обуславливается, вероятно, присутствием в его составе ~ 80% ненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой), которые придают клеточным мембранам необходимую текучесть, служат предшественниками других компонентов клетки и являются активаторами синтеза ряда ферментов. Полученные результаты согласуются с данными литературы о стимулирующем действии растительных масел на биосинтетическую активность дрожжей.

Библиография

1. GIULIANO G, AQUILANI R, DHARMAPURI S. *Metabolic engineering of plant carotenoids*. Trends Plant Sci 2000, 5:406-409.
2. LI L, VAN ECK J. *Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink*. Transgenic Res 2007;16:581-5.
3. PHAM ANH TUAN, JAE KWANG KIM. *Analysis of carotenoid accumulation and expression of carotenoid biosynthesis genes indifferent organs of chinese cabbage (brassica rapa subsp. Pekinensis)*. EXCLI Journal 2012;11:508-516 – ISSN 1611-2156 2012.
4. Usatfi A., Calcateniuc A., Şirşov T., Rudic V., Gulea A., Borisov T., Mediu nutritiv pentru cultivarea drojdiei *Spotobolomyces pararoseus*. *Br.inv. MD 1328*, 1999.09.30; BOPI N9/99.
5. WELSCH R, BEYER P, HUGUENEY P, KLEINIG H, VON LINTIG J. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 2000, 211:846-854.
6. ЗАЛАШКО, М.В. Физиологическая регуляция метаболизма. Мн.: Навука і тэхніка, 1991, с. 332.
7. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Г., Суденко В.И. и др., Каротинсинтезирующие дрожжи. Киев: Наукова думка, 1980, 171 с.