Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 2. – С. 15–19.
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2009. – Vol. 17, N 2. – P. 15–19.

УДК 633.18

А. С. Анацький, Є. О. Кунщикова

Товариство з обмеженою відповідальністю «Науково-виробниче підприємство "Вітан"»

ВПЛИВ СТУПЕНЯ АЕРАЦІЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ НА БІОСИНТЕТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ГРИБНОЇ КУЛЬТУРИ *BLAKESLEA TRISPORA*

У промислових умовах проведено дослідження біосинтетичних процесів гриба-продуцента β-каротину *Blakeslea trispora* при різних технологічних режимах аерації культуральної рідини. Показано, що збільшення ступеня аерації стимулює накопичення біомаси та каротиноутворення. Рекомендовано до використання технологічний режим, який передбачає подачу максимальної кількості повітря на аерацію з 10-ї години біосинтезу.

А. С. Анацкий, Е. А. Кунщикова

ООО «Научно-производственное предприятие "Витан"»

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ АЭРАЦИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ НА БИОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБНОЙ КУЛЬТУРЫ *BLAKESLEA TRISPORA*

В промышленных условиях проведено исследование биосинтетических процессов гриба-продуцента β-каротина *Blakeslea trispora* при разных технологических режимах аэрации культуральной жидкости. Показано, что увеличение степени аэрации стимулирует накопление биомассы и каротинообразование. Рекомендован к использованию технологический режим, предусматривающий подачу максимального количества воздуха и аэрацию с 10-го часа биосинтеза.

A. S. Anatsky, Y. A. Kunshchikova

Research and Production Enterprise "Vitan Ltd"

INFLUENCE OF AERATION DEGREE OF CULTURAL LIQUID ON BIOSINTETICAL ACTIVITY OF FUNGUS CULTURE *BLAKESLEA TRISPORA*

B-carotene biosynthetic processes of the fungus *Blakeslea trispora* are studied for different technological modes of cultural liquid aeration under industrial conditions. It is shown, that the increase of aeration degree stimulates the accumulation of biomass and carotene's formation. The operating practices of the maximal aeration since the 10th hour of cultivation are recommended to the use.

Вступ

Центральна стадія технологічного процесу виробництва каротинумісної біомаси – ферментація, під час якої проводять біосинтез β-каротину у ферментерах при спільному культивуванні «+» і «–» статевих форм міцеліального гриба *Blakeslea trispora* періодичним способом на патоково-екстрактних середовищах [7]. Численними дослідженнями встановлено, що рівень каротиноутворення біомаси залежить від фізіологічного

© А. С. Анацький, Є. О. Кунщикова, 2009

стану засівного матеріалу [3; 11], кількісного співвідношення «+» і «–» форм продуцента [14], присутності у живильному середовищі стимуляторів, стрес-чинників [5; 13]. Разом із тим, ефективність ростових і біосинтетичних процесів культури *Blakeslea trispora* як аеробного мікроорганізму визначається також режимом аерації ферментаційного середовища, оскільки, залежно від ступеня насиченості киснем культуральної рідини, змінюються такі параметри росту культури як загальний рівень біомаси, абсолютна та питома швидкість росту, інтенсивність споживання субстратів і накопичення цільових продуктів [6; 8; 10]. Серед фахівців-біохіміків, мікологів не існує чітко визначеної, загальновизнаної думки щодо участі кисню у ланцюгу біохімічних перетворень у клітинах продуцента при побудові з вуглецьумісних поживних сполук ізопреноїдного скелета молекул каротиноїдів, кінцевим продуктом яких є β-каротин. За однією з версій [4], нестача кисню у середовищі (як стрес-чинник для гриба, що обмежує його дихальну активність) викликає підвищений синтез β-каротину, за іншою гіпотезою [9], саме надлишок цього газу у культуральній рідині спричиняє посилення каротиноутворення, яке в цьому випадку є відповіддю – захистом мікроорганізму від збільшеного вмісту кисню. β-каротин при цьому як антиоксидант захищає молекули клітини від окиснення, руйнування, токсичної дії похідних форм кисневих сполук (пероксиду, кисневих радикалів тощо). Тому мета цієї роботи – з'ясувати вплив ступеня аерації культуральної рідини на інтенсивність біосинтетичних процесів культури *Blakeslea trispora* при різних технологічних режимах подачі повітря.

Матеріал і методи досліджень

У промислових умовах ТОВ «НВП "Вітан"» (смт. Дніпровське) проводили дослідні ферментації зі зміною кількості доданого у культуральну рідину повітря на різні години процесу, тобто фази розвитку періодичної культури (табл. 1). При цьому всі інші параметри (біохімічний склад живильного середовища, доза засівного матеріалу, температура) були сталими для розглянутих випадків.

Таблиця 1

Характеристика дослідних операцій ферментації

№ варіанта	Режим аерації		Результати ферментації		
	години ферментації	ступінь аерації	тривалість, год.	вміст цільових продуктів у культуральній рідині, % до контролю	
				біомаса	β-каротин
1	0–24 24 – до кінця	0,8 1,5	47	82	115
2	0–24 24 – до кінця	1,5 0,8	51	96	87
3	0–10 10 – до кінця	0,8 1,5	47	96	125
4	0 – до кінця	1,0	51	90	125
5 (контроль)	0–24 24–48 48 – до кінця	1,0 1,5 0,7	54	100	100

Контролем до дослідних варіантів слугував регламентний режим культивування, що передбачає разове збільшення ступеня аерації культуральної рідини від 1 до 1,5 л повітря/(л середовища*хв.) з 24-ї години від початку процесу та зменшення його до 0,7 з 48-ї години біосинтезу. Даний підхід до забезпечення гриба киснем базується на тому положенні, що підвищене його споживання припадає на другу добу ферментації, коли у культуральній рідині накопичується максимальний вміст життєздатних клітин і куль-

тура переходить у стаціонарну фазу – фазу синтезу β-каротину; натомість, у лаг-фазі, фазах прискореного та уповільненого росту, коли кількість клітин засівного матеріалу у середовищі ще мала, або у фазі відмирання, при поступовому автолізі біомаси, необхідність у кисні знижується, тому можливе й зменшення витрати повітря на аерацію.

Під час культивування визначали вміст біомаси у ферментаційному середовищі (ваговим методом після центрифугування проби культуральної рідини та сушіння вологого осаду) і β-каротину (вимірювання оптичної густини розчину β-каротину, вилученого ацетоном із дослідженої проби, на фотометрі фотоелектричному КФК-3.01-3 при довжині хвилі 450 нм [12]). При обробці експериментальних даних використовували дисперсійний аналіз, перевірку значущості впливу дослідженого фактора здійснювали за критерієм Фішера [1].

Результати та їх обговорення

Аналіз впливу ступеня аерації на біосинтетичну активність вирощуваної культури доцільно провести окремо для синтезу біомаси (рис. 1) і β-каротину (рис. 2).

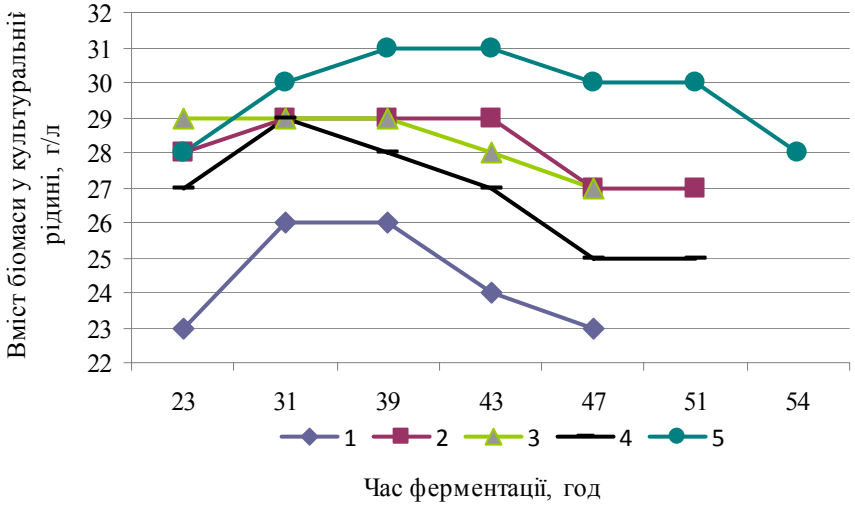

Рис. 1. Накопичення біомаси *Blakeslea trispora* при різних режимах (1–5) аерації культуральної рідини

Збільшення ступеня аерації культуральної рідини з 0,8 до 1–1,5 л повітря/(л середовища*хв.) дозволяє інтенсифікувати ріст і розмноження клітин засівного матеріалу: при цьому наприкінці першої доби ферментації спостерігається підвищення концентрації біомаси на 4–6 г/л, що підтверджує залежність ростових процесів від ступеня насиченості середовища киснем, свідчить про існування певного оптимуму та вказує на один із можливих шляхів стимуляції біосинтезу з метою збільшення збирання одного з цільових продуктів. Також має значення час зміни витрати аерувального повітря: якщо за технологічних режимів № 1, 2, 4 та 5 на другу добу ще відбувалось зростання вмісту біомаси і культура перебувала у фазі уповільненого росту (23–39-а години), то за варіанта № 3, коли посилення аерації здійснили з 10-ї години від початку процесу, культура вже була у стаціонарній фазі, про що говорить незмінна концентрація міцеліальної маси з 23-ї години. Таким чином, збільшення витрати повітря повинно припадати на початок ростових процесів продуцента, після фази адаптації засівного матеріалу до нових умов біосинтезу, відмінних від таких у засівних апаратах, що дасть змогу скоротити тривалість періодів росту зі збереженням загального рівня накопичення біомаси і при цьому зменшити тривалість усієї ферментації (у контрольному варіанті при ступі-

нчастій зміні витрати повітря вона найбільша). У фазі відмирання, незалежно від ступеня аерації, відбувається автоліз біомаси та зниження її концентрації у культуральній рідині на 2–3 г/л від максимального вмісту.

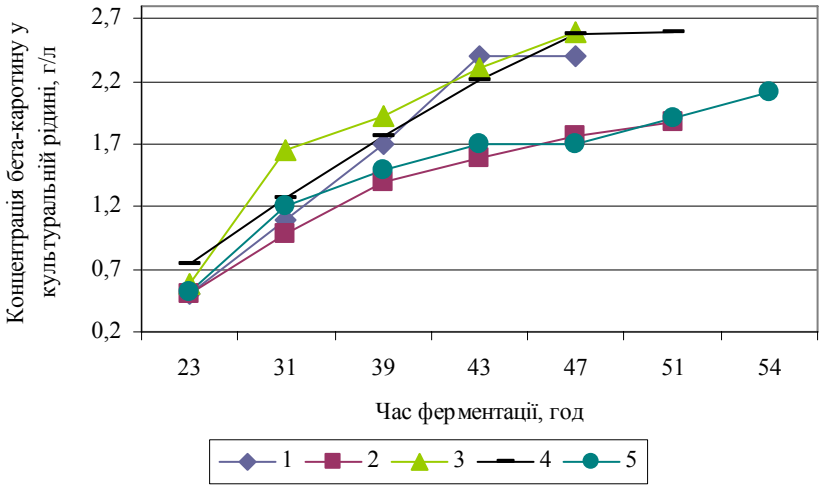

Рис. 2. Біосинтез β-каротину культурою *Blakeslea trispora*:
1–5 – номери дослідних за режимом аерації варіантів проведення ферментацій

З погляду кінцевого результату, вміст біомаси у дослідних операціях менший, ніж у контролі, проте різниця в 4 % відповідає лише 1 г біомаси/л за абсолютною величиною (див. табл. 1, рис. 1). Тому результати, одержані при режимах № 2 та 3, можна вважати близькими до таких у варіанті № 5, тим більше, що тривалість біосинтезу в них менша. Разом із тим, для повніших висновків та вибору оптимального режиму слід проаналізувати також криві синтезу β-каротину. β-каротин належить до вторинних метаболітів грибної клітини, його синтез відбувається, коли основний ріст біомаси вже закінчився, і припадає на 23–50-у години ферментації. Незалежно від режиму аерації на першу добу процесу, наприкінці її концентрація β-каротину в культуральній рідині практично однакова в усіх розглянутих варіантах (див. рис. 2). Різниця у біосинтетичній активності культури спостерігається з другої доби культивування: посилення аерації позитивно впливає на каротиноутворення, призводить до вищого вмісту цільового метаболіту (для порівняння: у варіанті № 2, в якому з 24-ї години процесу ступінь аерації був найменшим, найнижчий і вміст β-каротину). Можна зробити висновок, що збільшення ступеня насиченості середовища киснем здійснює стимулювальний вплив на каротиноутворення і це пояснюється, мабуть, як із біохімічного, так і з фізіологічного погляду. З одного боку, заключні етапи синтезу цільового метаболіту – дегідрування та циклізація молекул-попередників (фітоїну, лікопіну) [4] й "відняті" атоми водню при цьому за участю відповідних ферментів реагують із киснем з утворенням води, тому при зростанні його кількості у середовищі рівновага цих біохімічних реакцій буде зсуватися у бік утворення β-каротину. З іншого боку, надлишок кисню може бути токсичним для даного гриба-продуцента. Оскільки він не володіє розвиненими ферментними системами руйнування пероксидних сполук [2; 16] (зокрема, пероксиду водню [15]), для захисту клітин продукує більше β-каротину – одного з найпотужніших природних антиоксидантів. Звичайно, для з'ясування механізму впливу кисню на біосинтез необхідні глибші дослідження. Разом із тим, важливі для практики висновки можна зробити і з даної роботи.

Підсумовуючи вищерозглянуті результати, до промислового використання можна рекомендувати технологічний режим, що забезпечує ступінь аерації культуральної рідини 1,5 л повітря/(л середовища*хв.) протягом усього біосинтезу (варіант № 3 – з 10-ї години від засіву ферментера), за якого, поряд зі скороченням тривалості ферментації, досягається збільшення кількості синтезованого β-каротину на 25 % порівняно з контролем при однаковому з ним рівні концентрації біомаси (різниця не перевищує 1 г/л).

Висновки

Установлено стимулювальний вплив від збільшення ступеня аерації культуральної рідини на ростові та біосинтетичні процеси грибної культури *Blakeslea trispora*. Зростання ступеня насиченості середовища киснем призводить до скорочення тривалості фаз росту і, відповідно, всієї ферментації, а також викликає посилення синтезу β-каротину. Рекомендовано до використання у виробництві технологічний режим, який передбачає максимальну подачу аерувального повітря (1,5 л/(л середовища*хв.) з 10-ї години біосинтезу, на яку припадає закінчення лаг-фази періодичної культури та початок фаз росту).

Бібліографічні посилання

1. **Ахназарова С. В.** Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии / С. В. Ахназарова, В. В. Кафаров. – М. : Высшая школа, 1985. – 324 с.
2. **Беккер З. Э.** Физиология и биохимия грибов. – М. : МГУ, 1988. – 227 с.
3. **Зависимость** каротинсинтетической активности культуры *Blakeslea trispora* от условий хранения / И. В. Бондарь, В. М. Санникова, Н. А. Грищенко, Г. М. Стужук // Биотехнология. – 1985. – Т. 1, № 4. – С. 47–49.
4. **Бриттон Г.** Биохимия природных пигментов. – М. : Мир, 1986. – 422 с.
5. **Гончарова О. В.** Биохимические и структурные особенности *Blakeslea trispora*, адаптивные к воздействию среды / О. В. Гончарова, И. В. Конова, В. И. Бирюзова // Микробиология. – 1996. – Т. 35, № 1. – С. 54–59.
6. **Гусев М. В.** Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : МГУ, 1985. – 376 с.
7. **Егоров Н. С.** Промышленная микробиология. – М. : Высшая школа, 1989. – 688 с.
8. **Ждан-Пушкина С. М.** Основы роста культур микроорганизмов. – Л. : ЛГУ, 1983. – 187 с.
9. **Карнаухов В. Н.** Биологические функции каротиноидов. – М. : Наука, 1988. – 240 с.
10. **Манаков М. Н.** Теоретические основы технологии микробиологических производств / М. Н. Манаков, Д. Г. Победимский. – М. : Агропромиздат, 1990. – 272 с.
11. **Санникова В. М.** Определение времени наступления физиологической зрелости посевного материала *Blakeslea trispora* – продуцента *β*-каротина / В. М. Санникова, И. В. Бондарь, Г. М. Стужук // Биотехнология. – 1985. – Т. 1, № 5. – С. 107–109.
12. **Скурихин В. Н.** Методы анализа витаминов *A*, *E*, *D* и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства / В. Н. Скурихин, С. В. Шабаев. – М.: Химия, 1996. – 96 с.
13. **Терешина В. М.** Действие зеленого света на образование каротина и триспоровых кислот у мукорового гриба *Blakeslea trispora* / В. М. Терешина, А. Ф. Ивакин, А. И. Киселева // Прикл. биохим. и микробиол. – 1994. – Т. 28, № 3. – С. 415–420.
14. **Терешина В. М.** О биологической функции двух типов спороношения у мукорового гриба *Blakeslea trispora* / В. М. Терешина, А. С. Меморская, Е. П. Феофилова // Микробиология. – 1996. – Т. 35, № 6. – С. 777–781.
15. **Kollinson L. P.** Inducibility of the responses of yeast cell to peroxide stress // Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138. – P. 329–335.
16. **Lenaz G.** Role of mitochondria in oxidative stress // Biochem. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1366. – P. 63–67.

Надійшла до редколегії 10.03.2009