

ВПЛИВ ГЛІЦЕРОЛУ НА РІСТ ТА КАРОТИНОГЕНЕЗ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA (XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS)*

С. В. Гураль¹

Інститут біології тварин НААН

*Розроблено новий метод позитивної селекції на менадіон- та Си-селективних середовищах з використанням мутагену хімічної природи — N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину. Досліджено вплив гліцеролу на ріст та каротиногенез штамів дріжджів *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)* з різними фізіолого-біохімічними характеристиками. Встановлено, що приріст біомаси у досліджуваних штамів дріжджів посилювався при зростанні концентрації гліцеролу у середовищі. Вміст каротиноїдів у біомасі дріжджів за цих умов змінювався незначно, тоді як продуктивність зростала за рахунок приросту біомаси.*

На сьогодні відомо декілька сотень видів мікроорганізмів, які продукують біотехнологічні продукти. У процесі створення біотехнологічного продукту найважливішими етапами є пошук у природі і серед колекційних культур мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних речовин, а також підвищення рівня їхньої продуктивності.

Значна увага вчених концентрується на пошуку нових штамів мікроорганізмів з новими можливостями синтезу біологічно активних речовин, проводиться селекційна робота, в тому числі за допомогою методів генної та клітинної інженерії, робота із вибору оптимальних умов для їхньої життєдіяльності, розкриття біохімічних і фізіологічних механізмів взаємодії мікроорганізмів між собою та їх впливу на інші біологічні об'єкти. Це дає змогу вирішувати не лише фундаментальні питання життєдіяльності мікроорганізмів у природі, а й розробляти наукові основи створення нових біотехнологічних препаратів, продуктів та технологій на основі мікробного синтезу. Крім того, медична, сільськогосподарська та промислова галузі, які використовують мікробні біотехнології, майже повністю залежать від постачання продукції із-за кордону [1].

Унаслідок забруднення навколишнього середовища виникла потреба у природних біологічно активних сполуках, які діють як антимутагени, антиканцерогени або імуномодулятори [2]. Такі властивості характерні для каротиноїдів, які широко розповсюджені у природі. Велика кількість природних та синтезованих каротиноїдів посилює увагу до мікробних джерел отримання цих сполук [3, 4]. Мікроорганізми продукують декілька типів каротиноїдів як відповідну реакцію на стресові фактори довкілля [3]. Дріжджі *P. rhodozyma*, виділені у 1960 роках (Herman Phaff), синтезують каротиноїди, серед яких є і астаксантин, який захищає клітини від пошкоджень, викликаних активними формами кисню. Біосинтез астаксантину регулюють як склад середовища, так і умови культивування [5]. Астаксантин може використовуватись не лише як поживна добавка для птиці, форелі та лосося, але і як сильний антиоксидант. Він захищає фосфоліпідну мембрану клітини та інші ліпідні компоненти від окислення, захоплюючи вільний кисень та інгібуючи вільні радикали [6].

Одним з обмежень у використанні цих дріжджів, як комерційного джерела астаксантину, є низький вміст даного каротиноїду у виділених штаммах дикого типу.

¹ Науковий керівник — М. В. Гончар, Інститут біології клітини НАНУ

Тому проводиться селекція та розробка стратегій скринінгу для отримання мутантів — надпродуцентів каротиноїдів. Більшість комерційних мутантних штамів виділено внаслідок хімічного мутагенезу [5]. Однак, відомі роботи, в яких проводиться позитивна селекція з активними формами кисню для отримання вищої пігментації у клітинах [7]. Інший напрям досліджень скерований на генетичні модифікації біосинтезу астаксантину у дріжджів *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) [8–10].

Виробництво астаксантину залишається досить дорогим на сьогодні, що обмежує його інтенсивне використання [11]. Біотехнологічні процеси оптимізації культивування дріжджів забезпечуються умовами ферментації. Одним з важливих напрямків впливу на приріст біомаси є джерела Вуглецю, Азоту та їх співвідношення у середовищі. Крім того, науковці продовжують досліджувати вплив різних сполук, які можуть бути попередниками у біосинтезі важливих метаболітів, зокрема і каротиноїдів. Гліцерол вважають перспективним додатковим джерелом Вуглецю для культивування каротиновмісних дріжджів [12].

Тому актуальними залишаються біотехнологічні дослідження каротинпродукуючих дріжджів, в тому числі й за рахунок корекції складу середовищ культивування. Крім того, склад компонентів ферментації може відображати специфічність мутантних штамів внаслідок зміни шляхів біосинтезу вторинних метаболітів — каротиноїдів.

Метою роботи було дослідити вплив гліцеролу, як джерела вуглецю, на ріст та каротиногенез дріжджів *P. rhodozyma*.

Матеріали і методи. У роботі використовували 3 штами дріжджів *P. rhodozyma* — дикий тип NRRL Y-17268 та два мутантні штами, отримані при позитивній селекції на Cu- та менадіон-селективних середовищах після обробки мутагеном — N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідом (НГ) дикого типу.

Біомасу дріжджів нарощували на роторному шейкері при 200 об/хв у рідкому середовищі складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,9; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,15; дріжджовий екстракт — 2,0; глюкоза — 20,0; біотин — $1 \cdot 10^{-6}$. У дослідні варіанти до контрольного середовища додавали гліцерол з розрахунку, щоб кінцева концентрація в середовищі становила 15 г/л (182 мМ гліцеролу в середовищі) та 30 г/л (364 мМ гліцеролу) відповідно. В агаризоване середовище додавали агар з розрахунку 20 г/л.

Для визначення вмісту каротиноїдів у біомасі дріжджів культуру культивували у колбах Ерленмейера 116,5 год за температури 24 °C та аерації із заповненням колб на 10 % на роторному шейкері (200 об/хв). Інокулятом була одностодова культура дріжджів, вирощених на качалці у напівсинтетичному середовищі сталого складу за температури 24 °C. Приріст біомаси визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda = 580$ нм, кювета 5 мм) за оптичною густиною суспензії клітин з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин. Каротиноїди екстрагували сумішшю органічних розчинників гексан-етилацетат у співвідношенні 1:1 після попередньої обробки клітин диметилсульфоксидом [14]. Розрахунок концентрації каротиноїдів здійснювали за коефіцієнтом екстинкції для астаксантину в суміші розчинників гексан:етилацетат у співвідношенні 1:1, який становить 2,15. Оптичну густину забарвлених екстрактів каротиноїдів вимірювали на КФК-3 при $\lambda = 480$ нм (кювета 1 см).

Результати й обговорення. Для мікробного синтезу астаксантину використовують різні вуглецеві субстрати. Гліцерол вважають перспективним джерелом вуглецю у біосинтезі каротиноїдів дріжджами *P. rhodozyma* у збагачених середовищах (пептон, дріжджовий екстракт) [13]. Для досліджень обрано штами з різними фізіолого-біохімічними характеристиками: контроль (дикий штам), мутантні штами з посиленням синтезом каротиноїдів, отримані за різних умов селекції. Мутантний штам МЗ отриманий при позитивній селекції на менадіон-селективному середовищі (120 мкМ) після обробки клітин дикого штаму водним розчином НГ (0,35 г/л). В іншій серії досліджень при обробці дикого

штаму розчином НГ з кінцевою концентрацією 0,8 г/л протягом 5 хв при постійному перемішуванні отримано мутантний штам на Cu-селективному середовищі з концентрацією 10 мМ CuSO₄. Мутантні штами перевірено на рівень синтезу каротиноїдів: перший штам М3 синтезував у 2,8 рази більше каротиноїдів, ніж дикий штам за однакових умов культивування у рідкій культурі протягом 134 год., а продуктивність цього штаму (М3) була у 2,6 рази вища за контроль (дикий штам). Мутантний штам, отриманий на Cu-селективному середовищі, синтезував у 3,5 рази більше каротиноїдів, ніж вихідний штам.

Гліцерол, внесений у дослідні середовища до автоклавування, як додаткове джерело Вуглецю, оскільки в середовищі була і глюкоза (20 г/л як у контрольному середовищі, але без гліцеролу). Для всіх досліджуваних штамів спостерігалась тенденція до подовження фази росту клітин при зростанні концентрації гліцеролу у середовищі порівняно з контролем.

При концентрації 182 мМ гліцеролу у середовищі продуктивність дикого штаму знизилася на 7,5 %, порівняно з контрольним без гліцеролу (рис. 1), тоді як при 364 мМ гліцеролу продуктивність зросла в межах похибки (1,0 %).

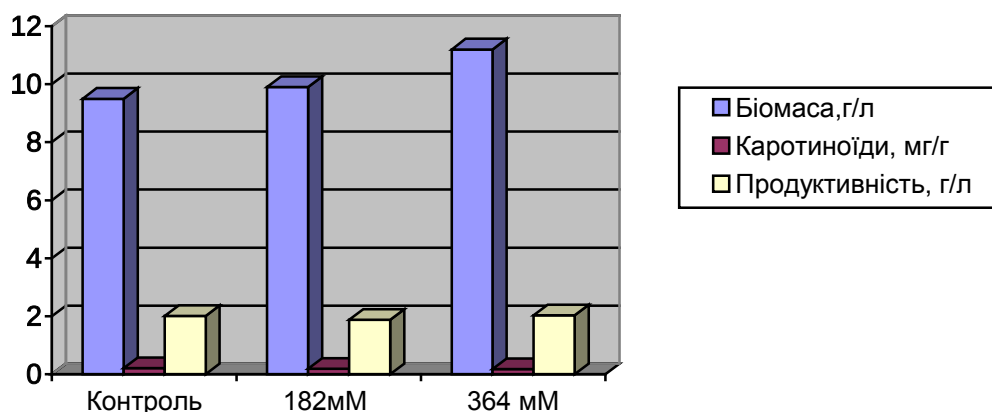


Рис. 1. Вплив гліцеролу на ріст та продуктивність дикого штаму дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-17268

Для мутантного штаму CuIII5 посилення продуктивності відбувалося у прямій кореляції з підвищенням вмісту гліцеролу у середовищах: на 20,2 % при концентрації 182 мМ гліцеролу та на 52,1 % при 364 мМ гліцеролу в середовищі до контрольного (рис. 2).

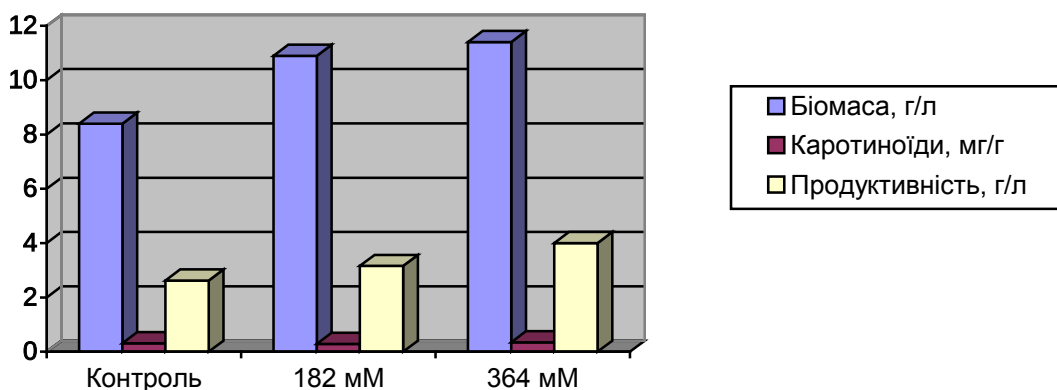


Рис. 2. Ріст та продуктивність мутантного штаму CuIII5 *P. rhodozyma*

Штам М3 мав вищу продуктивність відповідно на 45,96 % при концентрації 364 мМ (30 г/л) гліцеролу в середовищі відносно контрольного середовища.

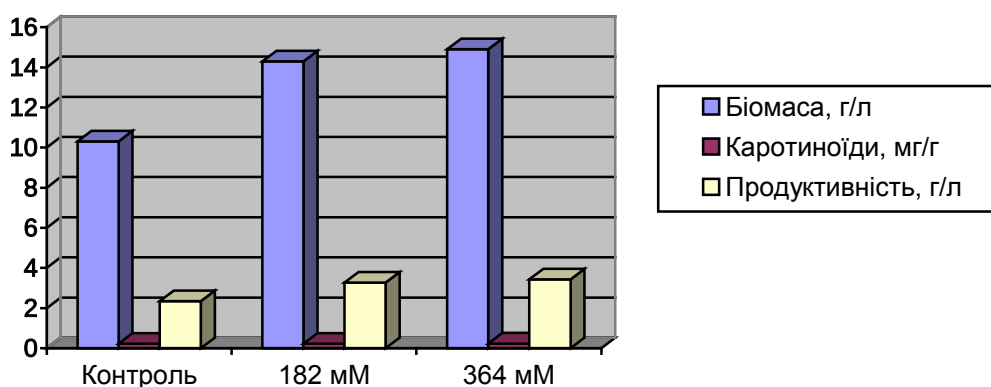


Рис. 3. Дія гліцеролу на ріст та продуктивність мутантного штаму М3 дріжджів *P. rhodozyma*

Гліцерол, як компонент середовища, поряд із основним джерелом Вуглецю (глюкозою) асимілюється дріжджами *P. rhodozyma*, ймовірно, через механізми активації процесів дихання. Дріжджі потребують значної кількості NADPH для синтезу амінокислот, а також астаксантину. Зниження споживання NADPH може пригнічувати синтез білку. Послаблене використання NADPH у первинному метаболізмі (такому як анаболізм) веде до зростання кількості NADPH, яка може бути використана для синтезу астаксантину. Утворення астаксантину посилюється при зростанні поглинання кисню (дихання) і репресується при утворенні етанолу (ферментація) [15]. Крім того, гліцерол і ацетат можуть бути прекурсорами у біосинтезі ацетил-КоА та терпенів [16]. Теоретично ці сполуки могли б посилювати утворення каротиноїдів у клітинах, особливо біосинтез бета-каротину. Однак, приріст біомаси залежить від можливого спільного використання гліцеролу та інших джерел живлення, що підтверджується нашими дослідженнями.

В И С Н О В К И

1. Проведено позитивну селекцію астаксантин-продукуючих дріжджів *P. rhodozyma* та отримано штами з Cu- та менадіон-селективних середовищ.
2. Для всіх досліджуваних штамів спостерігалась тенденція до подовження фази росту клітин при зростанні концентрації гліцеролу у середовищі порівняно з контролем.
3. Вміст каротиноїдів у біомасі дріжджів, вирощених у середовищі з гліцеролом, знижувався незначно, тоді як зміни в продуктивності відбувалися за рахунок приросту біомаси.

Перспективи подальших досліджень. Виявлено позитивний вплив гліцеролу на приріст біомаси при відносно сталому рівні каротиноїдів, що націлює на пошук оптимальних концентрацій гліцеролу у складі середовищ для промислового культивування біомаси дріжджів з різною пігментацією колоній та відповідно різним каротиноїдним складом.

EFFECT OF GLYCEROL ON THE GROWTH AND CAROTENOGENESIS OF THE YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA* (*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*)

S. V. Gural

Інститут

S U M M A R Y

It has been developed a new method of positive selection on menadion- and Cu-selective media using chemical mutagen — *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*. It has been studied the influence of glycerol on the growth and carotenogenesis of the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) with different physiological and biochemical characteristics. Biomass growth was enhanced with increasing glycerol concentration in media than control medium (without glycerol). Carotenoids content in yeast biomass changed slightly where productivity increased by increment of biomass.

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРОЛА НА РОСТ И КАРОТИНОГЕНЕЗ ДРОЖЖЕЙ *PHAFFIA RHODOZYMA* (*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*)

С. В. Гураль

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Разработан новый метод положительной селекции на менадион- и Cu-селективных средах с использованием мутагена химической природы — N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина. Исследовано влияние глицерола на рост и каротиногенез штаммов дрожжей *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) с разными физиолого-биохимическими характеристиками. Установлено, что прирост биомассы исследуемых штаммов дрожжей усиливался при увеличении концентрации глицерола в среде по сравнению с контрольным (без глицерола). Содержание каротиноидов в биомассе дрожжей изменялось незначительно, тогда как продуктивность возрастала за счет прироста биомассы.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Підгорський В. С. Мікробні біотехнології: наукові аспекти та умови реалізації / В. С. Підгорський // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 2. — С. 3–11.
2. Феофилова Е. П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование / Е. П. Феофилова // Приклад. Биохим. Микробиол. — 1994. — Т. 30, № 2. — С. 181–195.
3. Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms / P. Bhosale // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — Vol. 63, No. 4. — P. 351–361.
4. Frengova G. I. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* : yeast of biotechnological importance / G. I. Frengova, D. M. Beshkova // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — Vol. 36, No. 2. — P. 163–180.
5. Johnson E. A. *Phaffia rhodozyma* : colorful odyssey / E. A. Johnson // Int. Microbiol. — 2003. — Vol. 6, No. 3. — P. 169–174.
6. Капитанов А. Б. Каротиноиды — антиоксиданты клеточного метаболизма / А. Б. Капитанов, А. М. Пименов // Усп. Соврем. Биол. — 1996. — Т. 116, № 2. — С. 179–193.
7. Schroeder W. A. Selection for carotenogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* by dark-generated singlet oxygen / W. A. Schroeder, P. Calo, M. L. DeClercq, E. A. Johnson // Microbiology. — 1996. — Vol. 142, No. 10. — P. 2923–2929.

8. An G. H. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content / G. H. An, D. B. Schuman, E. A. Johnson // Applied and Environmental Microbiol. — 1989. — Vol. 55, No 1. — P. 116–124.
9. Lewis M. J. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with beta-ionone / M. J. Lewis, N. Ragot, M. C. Berlant, M. Miranda // Appl. Environ. Microbiol. — 1990. — Vol. 56, No. 9. — P. 2944–2945.
10. Visser H. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous* / H. Visser, A. J. J. Van Ooyen, J. C. Verdoes // FEMS Yeast Res. — 2003. — Vol. 4, No. 3. — P. 221–231
11. Ki-Moon P. Batch and continuous culture kinetics for production of carotenoids by beta-ionone-resistant mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* / P. Ki-Moon, M. W. Song, S. J. Kang, J. H. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 17, No. 7. — P. 1221–1225.
12. Martelli H. L. Glycerol as substrate for biomass and beta-carotene production by *Rhodotorula lactosa* / H. L. Martelli, I. M. da Silva, N. O. Souza, D. Pomeroy // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 1992. — Vol. 8, No. 6. — P. 635–637.
13. Kusdiyantini E. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentations / E. Kusdiyantini, Ph. Gaudine, G. Goma, Ph. J. Blanc // Biotechnology Letters. — 1998. — Vol. 20, No. 10. — P. 929–934.
14. Sedmak J. J. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* / J. J. Sedmak, D. K. Werasinghe, S. O. Jolly // Biotechnology Techniques. — 1990. — Vol. 4, No. 2. — P. 107–112.
15. Yamane Y.-I. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis / Y.-I. Yamane, K. Higashida, Y. Nakashimada et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — Vol. 63, No. 11. — P. 4471–4478.
16. Cuaresma M. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch system / M. Cuaresma, C. Casal, E. Forjan, C. Vilchez // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — P. 1–11.

Рецензент — провідний науковий співробітник лабораторії живлення овець та вовноутворення, кандидат сільськогосподарських наук В. В. Гавриляк, ІБТ НААН.