



**Каротиноиды,
микроорганизмы,
пигменты, торулин,
торулародин, β-каротин,
биосинтез**

*Carotenoids,
microorganisms, pigments,
torulin, torularhodin,
β-carotene, biosynthesis*

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ПРОЦЕСС БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ ДРОЖЖАМИ

Е. Кирица

к.б.н., доцент кафедры биотехнологии
ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА

Поиск биологически активных соединений, синтезируемых микроорганизмами, в настоящее время остается весьма актуальной задачей современной биотехнологии. Это обусловлено возможностью получения путем микробного синтеза различных продуктов, богатых витаминами, липидами, белками, микроэлементами и другими биологически активными веществами [1].

Из продуктов микробного синтеза особый интерес представляют каротиноиды, являющиеся наиболее многочисленной и распространенной группой природных пигментов. Они обнаружены у всех представителей растительного царства, как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих тканях. Эти пигменты часто встречаются у бактерий, грибов и в клетках многих животных, обуславливая их окраску, особенно птиц, рыб, ракообразных и насекомых [2].

С каждым годом потребность в каротиноидах возрастает, что требует расширения потенциальных источников их получения. В настоящее время каротиноиды можно получить путем химического синтеза, микробиологическим способом или выделением из растительного сырья.

Особое место среди продуцентов каротиноидов отводится красным дрожжам. Некоторые представители дрожжей (*Sporobolomyces*, *Phaffia*, *Rhodospseudomonas*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus*, *Sterigmatomyces*) способны синтезировать широкий спектр каротиноидов, количество которых может быть более 10 (ликопин, α-, β- и γ-каротин, неуроспорен, фитоеен, фитофлуен, лютеин, ликофил, ликоксантин, рубиксантин, криптоксантин, зеаксантин, виолаксантин, родоксантин, астаксантин, флавоксантин) [3, 4]. Наиболее часто среди них выделяются такие пигменты, как β-, γ-каротины, торулин, торулародин и ликопин. Среди пигментных дрожжей – источников каротиноидных пигментов – следует отметить штамм *Rhodotorula glutinis* ВКПМ V-2210, который на питательной среде, включающей источники углерода, азота и минеральные соли, в глубинных условиях образует биомассу, содержащую 1450–1500 мкг/г каротиноидов. Дрожжи *Phaffia rhodozyma* обладают двумя физиологическими особенностями

ми, отличающимися их от других пигментных дрожжей: они способны сбрасывать глюкозу и некоторые другие сахара; в спектре каротиноидов у них преобладает астаксантин – пигмент, встречающийся у некоторых водорослей, грибов и мелких ракообразных. Этот штамм представляет интерес с точки зрения получения биопрепаратов [5]. Исследователями также отмечена перспектива использования штамма *Rhodotorula gracilis* в качестве белково-витаминной добавки для нужд животноводства, способного синтезировать до 725 мкг/г сухой биомассы каротиноидных пигментов, качественный состав которых представлен в основном β-каротином (43%), торулином (35%) и торулародином (22%) [6].

В современной биотехнологии придается большое значение управляемому синтезу биологически активных веществ микроорганизмами. В настоящее время научные исследования, направленные на изучение условий управляемого синтеза биологически активных веществ дрожжами, являются актуальными и перспективными.

Очевидна целесообразность поиска таких добавок к питательным средам, которые при производственном культивировании дрожжей увеличили бы выход биомассы и продуктов метаболизма одновременно.

Исходя из вышеизложенного, нами были проведены исследования по изучению эффективности использования нетрадиционных источников питания для оптимизации питательных сред и разработаны эффективные способы направленного синтеза β-каротина, торулина и торулародина у дрожжей.

Одним из главных факторов для активной жизнедеятельности дрожжей является присутствие в питательной среде доступных источников энергии, к которым относятся углеводы. Выяснение первых метаболических путей (ферментации глюкозы в этанол и CO₂), проработанных дрожжами, согласно литературным данным, являлось моделью для всех последующих исследований промежуточного метаболизма живых организмов.

Известно, что ферментативное использование источников углерода дрожжами является их общей характеристикой. Все дрожжи способны к ферментации глюкозы, при этом интенсивность ферментации пропорциональна числу клеток и их физиологическому возрасту. Наличие витаминов в среде культивирования дрожжей также влияет на ход ферментации.

По данным литературы, наибольшая часть стоимости производства биомассы приходится

на сырье. Поиск эффективных дешевых источников сырья, с одной стороны, и эффективных путей утилизации отходов различных производств, с другой стороны, определяет целесообразность использования этих отходов и вторичных продуктов как источников энергии и вещества для получения биомассы и каротиноидов.

Следует отметить важность изучения возможности использования отходов пищевой промышленности, богатых источниками углерода, и, в свою очередь, создание экономных и эффективных питательных сред для культивирования дрожжей рода *Rhodotorula* – потенциальных источников каротиноидов.

Поэтому в наших исследованиях в качестве нетрадиционных источников питания для дрожжей были использованы экстракты виноградных, яблочных и томатных выжимок, являющиеся в Республике Молдова вторичным сырьем агропромышленного комплекса.

Материалы и методы исследований

Исследования были проведены в лаборатории «Биотехнологии дрожжей» Института Микробиологии и Биотехнологии Академии наук Республики Молдова.

Предметом исследований служил штамм дрожжей рода *Rhodotorula* из рабочей коллекции лаборатории «Биотехнологии дрожжей» и Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Академии наук Республики Молдова – *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 [7, 8].

Для сохранения культур и глубинного культивирования дрожжей была использована питательная среда MZ – 30 (г/л) (MD 1328): глицерин – 40,0; меласса – 20,0; KH₂PO₄ – 1,0; NaCl – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,5; CaCl₂ – 1,0; Fe₂SO₄·7H₂O – 0,00003 (следы); вода водопроводная – 1 л; pH = 5,5 [9].

Для повышения биосинтетического потенциала дрожжей были использованы нетрадиционные источники питания – экстракты растительных выжимок агропромышленного производства – виноградный, томатный, яблочный.

Экстракция пигментов проводилась на основании модифицированного метода Петерсона [10].

Результаты исследований

Согласно литературным данным и нашим исследованиям, количество сахаров в экстрактах варьирует от 10 до 43 мг/мл. Самое высокое содержание сахаров содержится в виноградном (43 мг/мл), томатном (10 мг/мл) и яблочном экстрактах

(33 мг/мл). Помимо сахаров экстракты растительных выжимок, согласно литературным данным, богаты витаминами РР и Е. Так, в яблочных отходах содержатся витамины группы РР (до 1,6%) и витамин Е (50 мг%); в виноградных выжимках – витамин РР (3 г%) и витамин Е (40 мг%). В томатных выжимках содержатся витамин Е (89 мг%) и каротиноидные пигменты – 18,5 мг%.

В исследованиях за основу была взята питательная среда МZ-30 следующего состава (г/л): глицерин – 40,0; меласса – 20,0; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 1,0; $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,00003 (следы); экстракт растительных выжимок – до 1 л; рН – 5,5. Инокулят дрожжей рода *Rhodotorula* вводился в среду культивирования в количестве 3–5%. Культивирование проводилось при температуре +25...+27°C на качалке режимом работы 180–200 об/мин, рН – 5,5–6,5, освещение – 12–15 тыс. эрг/см².

Первоначальной задачей было выяснение влияния присутствующих в составе среды культивирования экстрактов растительных выжимок на продуктивность и процесс каротинообразования штамма дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03.

Результаты проведенных исследований показали, что процесс аккумуляции клеточной массы дрожжей зависит от вида экстракта, присутствующего в среде культивирования дрожжей (табл. 1).

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что рост дрожжей происходит активно на всех исследуемых вариантах сред, количество биомассы при этом увеличивается по сравнению с контролем на 45–104%. Отметим, что культивирование штамма *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 на питательных средах, содержащих экстракт яблочных и томатных выжимок, способствует увеличению выхода клеточной массы дрожжей до 12,34 и 15,63 г/л соответственно, что на 61,27 и 104,27% больше контрольного значения. Наибольшая продуктивность биомассы, со-

гласно представленным результатам, отмечена при добавлении к питательной среде экстракта томатных выжимок (15,63 г/л).

Изучение влияния экстрактов растительных выжимок на процесс каротиногенеза дрожжей показало, что присутствие последних в питательной среде оказывает положительное действие на накопление пигментов в биомассе. Так, добавление в среду экстракта виноградных выжимок позволило увеличить количество каротиноидов в биомассе на 55,29%, что составляет 684,99 мкг/г сухих веществ. Следует отметить, что процесс пигментообразования дрожжами усиливался и при внесении в питательную среду экстракта томатных и яблочных выжимок на 41,49 и 24,56% соответственно по сравнению с контролем. Было выявлено, что при культивировании штамма дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 на питательной среде, содержащей экстракт томатных выжимок, количество пигментов увеличивалось до 9755,31 мкг/л, что в 2,8 раза больше контрольного значения.

Стимулирующий эффект экстракта томатных выжимок объясняется, вероятно, не только содержанием сахаров, которые являются дополнительным источником энергии, необходимой для активной жизнедеятельности дрожжей, но и наличием в его составе микроэлементов и витаминов.

Характер влияния экстрактов растительных выжимок на качественный состав пигментов дрожжей имеет ряд особенностей. На рисунке 1 представлены результаты изучения влияния экстрактов растительных выжимок на биосинтез β-каротина, торулина и торулародина.

Так, согласно результатам, представленным на рисунке 1 (а), видно, что биосинтез β-каротина дрожжами *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 активизируется при культивировании на питательных средах, содержащих любой из исследуемых

Таблица 1 – Влияние растительных экстрактов на продуктивность и содержание каротиноидов у дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03

Варианты питательных сред	Продуктивность		Содержание каротиноидов	
	г/л с. в. X1±X2	% К	мкг/г с. в. X1±X2	% К
MZ-30+экстракт виноградных выжимок	11,13±0,22	145,47	684,99±12,71	155,29
MZ-30+экстракт томатных выжимок	15,63±0,11	204,27	624,14±4,47	141,49
MZ-30+экстракт яблочных выжимок	12,34±0,36	161,27	549,45±17,72	124,56
MZ-30 (контроль)	7,65±0,29	100,00	441,12±11,88	100,00



Рисунок 1 – Влияние растительных экстрактов на содержание β-каротина (а), торулина (б) и торулародина (в) в биомассе дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03

экстрактов растительных выжимок. Содержание β-каротина в клетках дрожжей при этом увеличивается на 21–27% по сравнению с контролем. Следует отметить, что максимальный стимулирующий эффект достигается при культивировании пигментных дрожжей на питательной среде с экстрактом томатных выжимок: количество β-каротина составляет в данном варианте опыта 224,14 мкг/г с. в., или на 27 % больше по сравнению с контролем.

Анализ влияния экстрактов растительных выжимок на биосинтез одного из представителей красной группы пигментов – торулина (3', 4'-дегидро – γ-каротин) – показал, что данный процесс также зависит от вида экстракта, добавляемого в питательную среду для выращивания дрожжей. Как видно на рисунке 1 (б), внесение экстракта яблочных выжимок способствует увеличению количества торулина в клетках дрожжей на 20%, экстракта томатных выжимок – на 47% по отношению к контролю, а наличие в среде экстракта виноградных выжимок – увеличению выхода данного пигмента из 1 г сухой био-

массы на 102%, что составляет 315,69 мкг/г сухих веществ.

Биосинтез торулародина, согласно результатам проведенных исследований, происходил активно на всех питательных средах, в состав которых входили экстракты растительных выжимок. Однако наилучшие результаты были получены при культивировании штамма дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-YS-03 на питательной среде с экстрактом томатных выжимок – выход торулародина увеличился на 49% и составил 163,97 мкг/г с. в. (рис. 1 (в)).

Таким образом, проведенные исследования показали, что отходы агропромышленного производства – экстракты яблочных, виноградных и томатных выжимок – представляют практический интерес как дополнительные компоненты питательных сред для культивирования пигментных дрожжей. Использование экстракта томатных выжимок в качестве компонента питательных сред для выращивания пигментных дрожжей позволяет увеличить выход биомассы и каротиноидов в 2,5 раза.

Литература

1. Бабьева, И.П. Почвенные дрожжи [Текст] / И.П. Бабьева, С.Е. Горин. – М.: Изд-во Московского Уни-
верситета, 1987. – 78 с.
2. Карнаухов, В.Н. Биологические функции каротиноидов [Текст] / В.Н. Карнаухов. – М., 1993. – 248 с.
3. Феофилова, Е.П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование [Текст] / Е.П. Феофилова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – № 2. – Вып. 30. – С. 181–195.
4. Червякова, О.П. Исследование каротиногенеза дрожжей *Rhodotorula rubra* [Текст] / О.П. Червякова,
С.С. Караулова // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. под ред. П.Д. Саркисова и В.Б. Са-
жина. – М.: Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009. – № 10. – Т. XXIII. – С. 103.
5. Rudic, V. Sinteza orientată a carotenoidelor și bilipoproteidelor de către unele microorganisme fototrofe
[Textul] / V. Rudic, A. Gulea, C. Turtă și al. // Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria «Științe
chimico-biologice». – Chișinău, 2000. – P. 50–57.

6. Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms [Textul] / P. Bhosale // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – V. 63. – P. 351–361.

7. Usatii, A. Bazele fiziologo-biochimice și biotehnologice de cultivare a drojdiilor oleogene și obținerea preparatelor bioactive [Textul]: autoreferat al tezei de doctor habilitat în șt. Biologice / Agafia Usatii. – Chișinău, 2002. – 36 p.

8. Tamaș, V. Pigmenți carotenoidici si metabolite [Textul] / V. Tamaș, G. Neamțu. – Bucuresti: Cereș, 1986. – Vol. 1. – P. 269–295.

9. Usatii, A. Mediu nutritiv pentru cultivarea drojdiei *Spotobolomyces pararoseus* [Textul] / A. Usatii, A. Calcateniuc, T. Șirșov, V. Rudic, A. Gulea, T. Borisov // *Br.inv. MD 1328*, 1999.09.30; BOPI N9/99.

10. Вечер, А. Спектрофотометрическое определение содержания каротиноидов в биомассе микроорганизмов [Текст] / А. Вечер, А.Н. Куликова // *Физиолого-биохимические исследования растений.* – Минск, 1967. – С. 44–54.

References

1. Bab'eva, I.P. Pochvennye drozhzhi [Tekst] / I.P. Bab'eva, S.E. Gorin. – M.: Izd-vo Moskovskogo Univ-ta, 1987. – 78 s.

2. Karnauhov, V.N. Biologicheskie funkții karotinoidov [Tekst] / V.N. Karnauhov. – M., 1993. – 248 s.

3. Feofilova, E.P. Karotinoidy gribov: biologicheskie funkții i praktičeskoe ispol'zovanie [Tekst] / E.P. Feofilova // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija.* – 1994. – № 2. – Vyp. 30. – S. 181–195.

4. Chervjakova, O.P. Issledovanie karotinogeneza drozhzhej *Rhodotorula rubra* [Tekst] / O.P. Chervjakova, S.S. Karaulova // *Uspehi v himii i himičeskoj tehnologii: sb. nauch. tr. pod red. P.D. Sarkisova i V.B. Sazhina.* – M.: Izd-vo RHTU im. D.I. Mendeleeva, 2009. – № 10. – T. XXIII. – S. 103.

5. Rudic, V. Sinteza orientată a carotenoidelor și bilipopreteidelor de către unele microorganisme fototrofe [Textul] / V. Rudic, A. Gulea, C. Turtă și al. // *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria «Științe chimico-biologice».* – Chișinău, 2000. – P. 50–57.

6. Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms [Textul] / P. Bhosale // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – V. 63. – R. 351–361.

7. Usatii, A. Bazele fiziologo-biochimice și biotehnologice de cultivare a drojdiilor oleogene și obținerea preparatelor bioactive [Textul]: autoreferat al tezei de doctor habilitat în șt. Biologice / Agafia Usatii. – Chișinău, 2002. – 36 p.

8. Tamaș, V. Pigmenți carotenoidici si metabolite [Textul] / V. Tamaș, G. Neamțu. – Bucuresti: Cereș, 1986. – Vol. 1. – P. 269–295.

9. Usatii, A. Mediu nutritiv pentru cultivarea drojdiei *Spotobolomyces pararoseus* [Textul] / A. Usatii, A. Calcateniuc, T. Șirșov, V. Rudic, A. Gulea, T. Borisov // *Br.inv. MD 1328*, 1999.09.30; BOPI N9/99.

10. Večer, A. Spektrofotometricheskoe opredelenie soderzhanija karotinoidov v biomasse mikroorganizmov [Tekst] / A. Večer, A.N. Kulikova // *Fiziologo-biohimicheskie issledovanija rastenij.* – Minsk, 1967. – S. 44–54.