

**Культивирование дрожжей *Phaffia rhodozyma* при постоянном и периодическом освещении**

Захаров З.В., к.т.н. Герман Л.С., Петрищева О.А., Жарко М.Ю.  
Университет машиностроения

*Аннотация.* Исследовано влияние постоянного и периодического освещения люминесцентными лампами в пределах от 0 до 9500 лк на рост биомассы культуры *Phaffia rhodozyma* и синтез астаксантина при периодическом культивировании в биореакторе. Установлено, что при освещённости 7500 лк периодический способ воздействия светом позволяет культуре синтезировать столько же астаксантина, сколько при постоянном освещении. Показано, что постоянное воздействие светом 7500 лк ведёт к большему увеличению лаг-фазы биосинтеза астаксантина и роста биомассы, чем периодический свет.

*Ключевые слова:* *Phaffia rhodozyma*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, астаксантин, освещённость, индукция биосинтеза астаксантина.

**Введение**

Астаксантин – высший каротиноид, сильнейший из известных антиоксидантов. Дрожжи *Phaffia rhodozyma* – перспективный источник астаксантина и других биологически ценных веществ. Поиск эффективного производства продуцента астаксантина – одна из важных биотехнологических задач. Однако сегодняшние технологии получения продукта, содержащего астаксантин, дороги. Во многом это связано с большими энергозатратами на освещение, необходимого для индукции каротиногенеза клетками. Таким образом, мероприятия по снижению затрат на освещение позволяют снизить себестоимость производства дрожжей *Phaffia*.

Известно, что избыток световой энергии ингибирует рост биомассы *Phaffia rhodozyma* и биосинтез астаксантина [1]. В отсутствии света накопление астаксантина клетками дрожжей Ph.rh. существенно ниже, чем при постоянном освещении культуральной жидкости [2]. Одновременно с этим оптимальным для каротиногенеза является свет низкой интенсивности [3].

Данные по влиянию периодического освещения на рост биомассы и накопление астаксантина в настоящее время отсутствуют.

Целью данного исследования является определение экспериментальным путём зависимости выхода астаксантина и роста биомассы дрожжей Ph.rh. от способа освещения (постоянное и периодическое).

**Материалы и методы исследования**

Объектом исследования являлась культура дрожжей *Phaffia rhodozyma*, штамм ВКПМ Y-2228. Штамм Y-2228 получен как мутант с усиленной пигментацией после обработки Y-2218 нитрозогуанидином.

Освещённость задавалась использованием компактных люминесцентных ламп белой цветности КЛ18/БЦ (г. Саранск). Периодическое включение/выключение ламп осуществлялось с помощью реле времени «УТ24» («Овен», Россия).

Освещённость 7000 лк задавалась различным расстоянием от источника света до прозрачной стенки биореактора и определялась при помощи люксметра – УФ-радиометра ТКА - 01/3 (г. Санкт-Петербург).

Посевной материал получали методом смыва с агаризованной среды, после чего колбы объёмом 250 мл, содержащие 20 мл суспензии, помещали на качалку фирмы «New Brunswick Scientific» на 42 часа с автоматическим поддержанием температуры  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$  при 300 об/мин.

Контроль температуры и рН осуществлялся непрерывно в течение всего процесса культивирования. Для поддержания рН на уровне 4,5 использовался 10%-й раствор NaOH.

Глубинное культивирование осуществлялось в лабораторных ферментёрах «Bioflo» 110 вместимостью 1 л фирмы «New Brunswick Scientific» (США). Культивирование осуществлялось в асептических условиях.

Длительность ферментации составила в среднем 72 часа – до исчерпания углеродного субстрата (периодический способ культивирования, без внесения дополнительной среды).

Применялся оптимальный состав ферментационной среды, содержащий кукурузный экстракт (КЭ) и ферментолитат крахмала (ФК), который получен в предшествующих экспериментах. Начальное содержание редуцирующих веществ (РВ) составляло  $10,0 \pm 0,2\%$ .

Подача воздуха имела постоянное значение – 1,3 л воздуха на 1 л КЖ.

Концентрацию редуцирующих веществ определяли по модифицированной методике Бертрана-Шоорля.

Концентрацию астаксантина измеряли методом тонкослойной хроматографии. Для этого клетки предварительно разрушали баллистическим способом с использованием стеклянных шариков диаметром 0,2-0,5 мм. Последующая экстракция осуществлялась с помощью этилового спирта. В качестве сорбента использовался силикагель, нанесенный на стеклянные пластинки тонким слоем. В качестве подвижной фазы применялась смесь: гексан : ацетон : ледяная уксусная кислота (30 : 20 : 1,5). Детектирование пятен при этом проводилось без использования реагентов по естественной окраске самого астаксантина. Количественное определение астаксантина осуществлялась на компьютере после сканирования хроматограммы с помощью специальной программы при сравнении площадей и интенсивности окрашенных пятен относительно пятен стандартных образцов астаксантина. Для приготовления стандартных растворов используется образец астаксантина с заведомо известной концентрацией (определенной методом ВЭЖХ).

Контроль стерильности питательных сред осуществляли биологическим методом, высеивая испытуемую пробу на твердую богатую питательную среду для провокации роста микроорганизмов.

Определения сухой биомассы осуществлялось в пробах объёмом 1,0 мл в пробирках Eppendorf с предварительным отделением биомассы на центрифуге и однократной промывки и последующей сушке в сушильном шкафу при температуре  $105,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  (производства СССР).

### Экспериментальная часть

Биологическая роль света в образовании астаксантина клетками дрожжей *Ph. rhodozyma* известна давно, однако исследований в области влияния способа воздействия (постоянное и периодическое) до сих пор не было проведено.

Время спорообразования клетками дрожжей *Ph. rhodozyma* составляет около 4 часа. Исходя из этого для первого варианта светового воздействия была выбрана длительность цикла – 4 часа. Длительность же светового периода в 4-часовом цикле составляла 7 минут, исходя из длительности полного разгорания лампы.

Во втором варианте световое воздействие было постоянным.

В качестве контроля культивирование проводили в темноте.

В статье представлены усреднённые данные 3-х опытов. Значения доверительных интервалов составляют: для сухой биомассы 1,5 г/л, для накопленного астаксантина 0,055 мг/гСБМ.

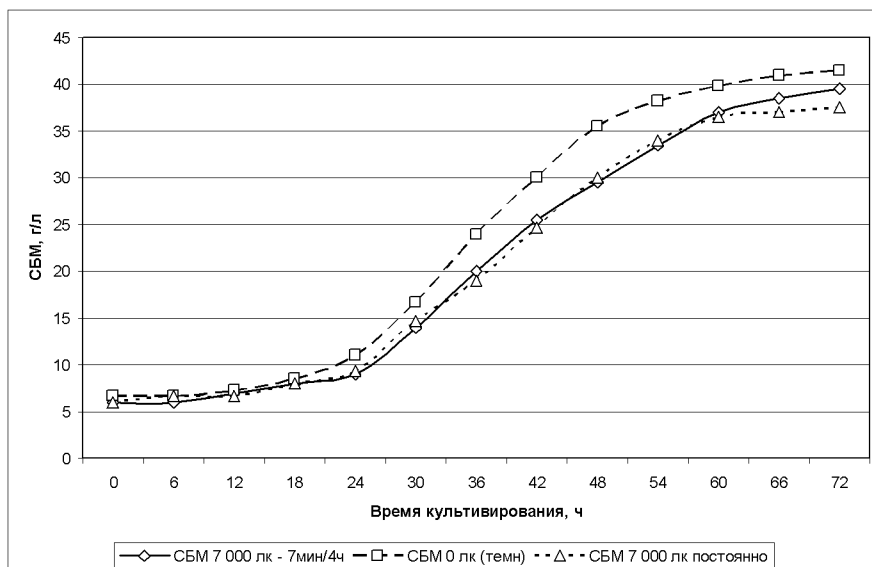
### Результаты и выводы

График изменения биомассы в процессе культивирования представлен на рисунке 1.

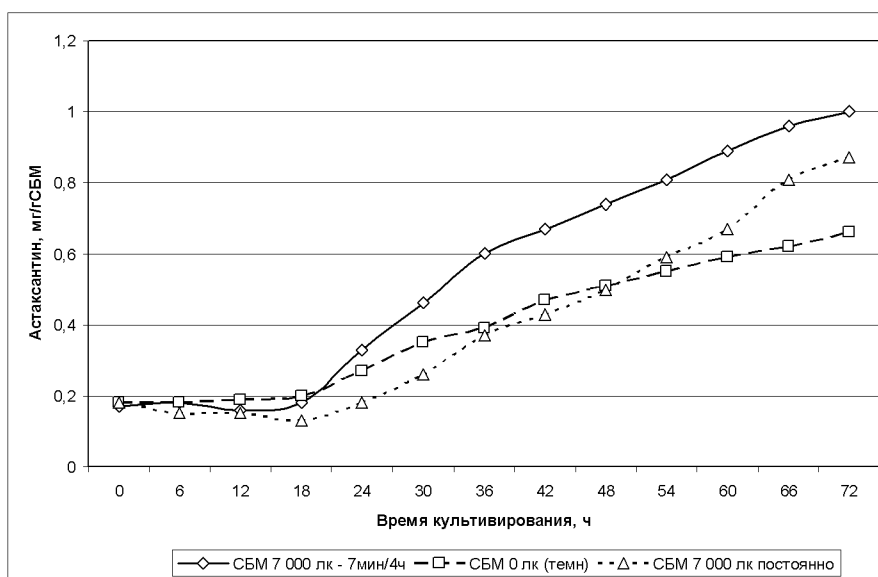
При культивировании клеток дрожжей *Ph. rhodozyma* в присутствии света, начиная с 24-го часа, наблюдается замедление накопления биомассы по сравнению с культивированием в темноте. Однако к концу процесса накопленная биомасса почти одинакова.

Анализ графика изменения накопления астаксантина (рисунок 2) показывает, что воздействие постоянным светом освещённостью 7000 лк на клетки вызывает ингибирование ка-

ротиногенеза. Кривая изменения накопления астаксантина клетками *Ph. rhodozyma*, культивируемыми в темноте, расположена стабильно ниже начиная с 24-го часа культивирования до окончания процесса. При этом растёт разница накопления астаксантина по сравнению с индуцированными светом клетками.



**Рисунок 1 – Динамика накопления биомассы**



**Рисунок 2 – Динамика накопления астаксантина**

Это можно объяснить тем, что новые клетки, не индуцированные светом, либо не задействованы в образовании астаксантина, либо задействованы в незначительной степени.

Характер биосинтеза астаксантина клетками, находящимися под постоянным сильным (7000 лк) воздействием света в ферментёре показывает, что в начале процесса культивирования (до 24-го часа) постоянный свет ингибирует каротиногенез.

Количество накопленного клеткой астаксантина при периодическом освещении (7000 лк) культуральной жидкости выше, чем при постоянном воздействии светом при тех же значениях освещённости.

Периодическое воздействие светом позволяет снизить энергозатраты в 35 раз с выходом астаксантина 39,5 мгАХ/л.

Скорость роста биомассы и её конечное количество в отсутствие света выше, чем при воздействии светом.

### **Заключение**

Фотоиндукция биосинтеза астаксантина клетками дрожжей *Ph. rhodozyma* может осуществляться периодическим способом. Такой способ освещения позволяет воспроизвести процесс культивирования продуцента астаксантина в промышленных масштабах, если применять выносные осветительные устройства различной конструкции, существенно экономить электроэнергию на освещение, необходимую для индукции каротиногенеза и использовать для культивирования стандартные промышленные биореакторы любой вместимости.

### **Литература**

1. An G.H., Johnson E.A. (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57: 91–103.
2. Vazquez M. (2001) Effect of the light on carotenoid profiles on *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Food Technol Biotechnol* 39: 123–128.
3. Schmidt I. et al. *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma / Xanthophyllomyces dendrorhous / Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer, 2010.

### **Подбор конструкции мешалки и режима перемешивания для аэрации нефтезагрязненной почвы**

д.т.н. проф. Крамм Э.А., к.т.н. Заборская А.Ю.  
*Университет машиностроения*  
8-499-267-12-37, a.zaborskaia@yandex.ru

*Аннотация.* В статье представлены данные исследований влияния аэрации посредством механического перемешивания на процесс биодegradации углеводов в почве. Предложены различные варианты перемешивающих устройств и режимов перемешивания.

*Ключевые слова:* биокомпостирование, нефтезагрязненная почва.

Основными факторами, влияющими на процесс биокомпостирования, являются источники питания, дисперсность частиц, влажность, структурно-механические свойства грунта, аэрация, перемешивание, рН [1].

Проведенные нами ранее эксперименты показали, что режим аэрации играет решающую роль в процессе биоокисления углеводов в почве [2].

Нами была разработана лабораторная установка (рисунок 1) для изучения процесса биодegradации нефтезагрязненного грунта в динамических условиях (в условиях механического перемешивания – аэрации). Биореактор 1 представляет собой цилиндрический аппарат на подвижной платформе, оснащенной динамометром 6 для измерения реактивного крутящего момента. Аппарат оснащен механическим регулируемым приводом (2) мешалки-аэратора 3 и измерительной аппаратурой.

Установка работает следующим образом. Реактор с загрузкой устанавливается на подвижную платформу, оборудованную упорным подшипниковым узлом и шкивом. Нить, связанная с электронным динамометром, помещается в ручей шкива таким образом, что при вращении мешалки усилие, связанное с её вращением фиксируется динамометром, а в дальнейшем пересчитывается в крутящий момент. Регулируемый привод позволяет варьировать скорость вращения мешалки, а также осуществлять прерывистые режимы.

Были испробованы 6 видов перемешивающих устройств: пропеллерная мешалка; скребковая мешалка; винтовая мешалка; мешалка тип I; мешалка тип II; мешалка тип III; мешалка тип IV.

Кроме непрерывного, нами исследованы «интерраптные» (прерывистые) режимы перемешивания. Так как при очистке почвы на месте загрязнения рыхление производят не постоянно, а около 2-х раз в неделю, мы предположили, что при обработке почвы в биореакто-