

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВ РОДА *EREMOTHECIUM* S.F.ASHBY ET W.NOWELL

Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Моисеева И.Я.

ГОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, e-mail: sef1957@mail.ru

Выявлены макро-, микроморфологические и физиолого-биохимические особенности штаммов, относящихся к видам рода *Eremothecium*. В сравнительном аспекте изучена динамика накопления рибофлавина и эфирного масла в процессе онтогенеза.

Ключевые слова: *Eremothecium ashbyi* Guilliermond, *Eremothecium gossypii* Kurtzman, продуценты рибофлавина и эфирного масла, культурально-морфологические признаки, физиолого-биохимические свойства

CULTURAL-MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL FEATURES OF GENUS *EREMOTHECIUM* S.F.ASHBY ET W.NOWELL SPECIES

Semenova E.F., Shpichka A.I., Moiseeva I.Ya.

The Penza State University, Penza, e-mail: sef1957@mail.ru

The macro-, micromorphological and physiological-biochemical features of strains of genus *Eremothecium* species are revealed. The dynamics of riboflavin and essential oil accumulation in ontogenetic process is studied in comparative aspect.

Keyword: *Eremothecium ashbyi* Guilliermond, *Eremothecium gossypii* Kurtzman, overproducers of riboflavin and essential oil, cultural-morphological traits, physiological-biochemical properties

В последние десятилетия активно изучаются летучие продукты микробного метаболизма для выяснения их роли в аллелопатических взаимодействиях микро- и макроорганизмов. Прикладной аспект проблемы биосинтеза и накопления летучих метаболитов позволяет рассматривать микроорганизмы в качестве нетрадиционных источников получения натуральных душистых веществ, применяемых в медицине, фармацевтической, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности.

Скрининг биосинтетической способности более 50 культур мицелиальных грибов, относящихся к видам *Ceratocystis paradoxa*, *C.pilifera*, *Eremothecium ashbyi*, *Ashbyi gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Asp. foetidus*, *Penicillium canescens*, *Trichoderma viride* и ряду других, показал, что они могут продуцировать эфирные масла, содержащие ценные компоненты [4, 5, 7, 9]. Качественный состав и количественное содержание (22,3...424,1 мг/л культуральной жидкости) синтезируемых летучих соединений весьма разнообразны и обусловлены как генетическими факторами, так и условиями культивирования.

Наибольшее количество эфирного масла синтезировали коллекционные штаммы рода *Eremothecium* – до 180 мг/л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что сопоставимо с содержанием эфирного масла в 500...600 г цветков

розы. Основными компонентами являются гераниол (69,5...84,9%) и β-фенилэтанол (12,7...27,7%), а также идентифицированы нерол, цитронеллол, нераль и гераниаль, что свидетельствует о сходстве изучаемого масла с эфирным маслом из свежих цветков розы. Наряду с ароматообразующими соединениями штаммы продуцируют витамин В₂ (рибофлавин) – до 137 мг/л культуральной жидкости и при этом различаются уровнем флавиногенеза [1-3, 8].

Целью данного исследования является изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей видов рода *Eremothecium* в связи с динамикой накопления рибофлавина и эфирного масла.

Материал и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-124, ВКМ F-3009 (мутант, получен селекционным путем из штамма ВКМ F-124) и *Eremothecium gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним *Ashbya gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guilliermond 1928) ВКМ F-1398, ВКМ F-3276 (мутант, получен путем отбора из штамма ВКМ F-1398), ВКМ F-3296. Данные микроорганизмы относятся к царству *Fungi*, типу *Ascomycota*, классу *Endomycetes*, порядку *Saccharomycetales*, семейству *Spermothoraceae* (*Nematosporaceae*). Изучаемые штаммы не являются патогенными для человека, так как не относятся к 1–4-й группе патогенности согласно Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322–08. Безопас-

ность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2008.

Культуры поддерживали при 4°C на скошенной агаризованной среде, содержащей соевую муку (4%) и сахарозу (1%) [10], сусло-агаре, агаре Сабуро, картофельно-глюкозном агаре, мясо-пептонном агаре, среде Чапека, питательном агаре [7]. Ферментацию осуществляли в течение 18...84 часов в жидкой питательной среде (10 мл) в микробиологических пробирках на качалках (150 об./мин). Культуральную жидкость (КЖ) в трехкратной повторности отбирали каждые 12 ч, начиная с 24 ч культивирования. Мицелий отфильтровывали, биомассу определяли после высушивания при 100°C до постоянной массы, фильтрат культуральной жидкости экстрагировали диэтиловым эфиром или липиды извлекали трехкратной экстракцией гексаном. Растворитель удаляли на роторном испарителе под вакуумом, остаток липидов взвешивали. Навеску липидов растворяли в гексановом растворе внутреннего стандарта (2 мг ментола в 1 мл гексана) и анализировали содержание ароматобразующих соединений (АОС) методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Содержание рибофлавина определяли спектрофотометрически при 445 нм после предварительного гидролиза культуральной жидкости при 100°C в течение 30 мин в присутствии 6 н раствора соляной кислоты. Морфологию культур исследовали под микроскопом БИОМЕД-3 (кратность увеличения 10, 40) в нативных и окрашенных метиленовым синим микропрепаратах. Фотографирование осуществляли аппаратом Panasonic DMC-FX100 с объективом Lumix 12 mega pixels.

Результаты исследования и их обсуждение

Макроморфология

E. ashbyi на твердой агаризованной среде образует плоские матовые (позднее глянцево-желтые) колонии желтого цвета, легко снимающиеся с агара. Форма колоний округлая, диаметром 8...12 мм (на сусло-агаре через 3 сут. роста при 28°C). На мясо-пептонном, питательном агарах и агаре Сабуро пигментация изучаемых штаммов менее выражена по сравнению с глюкозо-картофельным агаром, сусло-агаром, средой Чапека.

Следует отметить, что популяция штамма *E. ashbyi* ВКМ F-124 была наиболее гетерогенна, по сравнению с другими изучаемыми штаммами, по некоторым количественным характеристикам отдельных колоний (диаметру, пигментации и др.).

E. gossypii образует колонии, которые на сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре, среде Чапека с кукурузным экстрактом через 3 суток роста при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$ достигают 6 мм, пигментированы, желтого цвета с четким краем. Форма колоний округлая, они плоские, матовые, плотные, с агара легко снимаются петлей в виде пленки. Спустя 10 суток светло-желтые, слегка выпуклые в середине, с поверхностно-разбросанным бесцветным краем. Пигмент (рибофлавин) окра-

шивает среды в желто-коричневые тона. Рост по штриху на среде Чапека – скудный, сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре – умеренный, на среде Чапека с кукурузным экстрактом, питательном агаре – хороший.

Микроморфология

E. ashbyi имеет дихотомически ветвящийся мицелий, состоящий из многоядерных клеток. Диаметр гиф варьирует в пределах 2,5...16,5 мкм. Спорангии продолговатые многоспоровые, конидии веретеновидные. Размеры аскоспор составляют: длина – 20,2...26,7 мкм, диаметр – 2,5...2,8 мкм.

При культивировании штаммов *E. gossypii* на твердых питательных средах и в аналогичных жидких средах существенных отличий микроморфологических показателей (форма, размеры клеток и т.п.) не наблюдалось. Спорогенез начинается при старении культуры, не ранее стационарной фазы: аски с аскоспорами образуются интеркалярно, а почкующиеся клетки (конидии) – терминально или латерально на гифах мицелия.

Физиолого-биохимическая характеристика

Особенности физиологии видов *Eremothecium* (табл. 1) исследовали в различных условиях культивирования: варьировали температурные показатели, значения исходного pH и режимы аэрации. Изучаемые микроорганизмы растут в диапазоне температур 20...35°C, оптимальная область – 26...28°C (при 37°C не растут). Область pH для роста 3,2...7,5, оптимум pH 5,5...6,5. По отношению к кислороду являются аэробами в условиях поверхностного и глубинного культивирования.

Использование (утилизация) источников углерода и азота видами рода *Eremothecium* изучалось в основном на модификациях среды Чапека.

При этом потребление изучаемыми штаммами единственных источников углерода и энергии, а также азота происходит с различной интенсивностью.

Как отмечалось ранее, микромицеты *E. ashbyi* и *E. gossypii* являются продуцентами рибофлавина и эфирного масла, основными ароматобразующими соединениями которого являются гераниол, нерол, цитронеллол, β-фенилэтанол. Однако доля этих веществ в составе синтезированных мицелием *E. gossypii* липидов существенно выше, по сравнению с *E. ashbyi*, причем соотношение монотерпеновых спиртов более приближено к содержанию их в розовом эфирном масле. Основные компоненты и их процентное соотношение в смесях ароматобразующих соединений, синтезирован-

ных *E. ashbyi* и *E. gossypii*, представлены в табл. 2.

Минорными составляющими смеси душистых веществ являются нераль, гераниаль, эфиры монотерпеновых спиртов, ли-

налоол, свойственные маслам розового направления. Следует отметить, что определенное варьирование приведенных показателей обусловлено различным составом питательных сред.

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства видов рода *Eremothecium*

Свойство	<i>E. ashbyi</i>	<i>E. gossypii</i>
Источники углерода для роста		
– глюкоза	Утилизирует	Утилизирует
– фруктоза	Утилизирует	Не определяют
– галактоза	Не определяют	Не утилизируют
– ксилоза	Не определяют	Не утилизируют
– арабиноза	Не определяют	Не утилизируют
– рамноза	Не определяют	Не утилизируют
– мальтоза	Не определяют	Утилизируют
– сахароза	Не определяют	Утилизируют
– рафиноза	Не определяют	Утилизируют
– инозит	Не утилизируют	Не утилизируют
– дульцит	Не определяют	Не утилизируют
– маннит	Не определяют	Не утилизируют
– сорбит	Не определяют	Не утилизируют
– глицерин	Утилизируют	Не определяют
– этанол	Не определяют	Утилизируют
– глюкозамин	Не определяют	Не утилизируют
– ацетат	Утилизируют	Не определяют
– цитрат	Утилизируют	Не утилизируют
– крахмал	Не утилизируют	Не определяют
– целлюлоза	Не утилизируют	Утилизируют
Гидролиз казеина	Наблюдается коагуляция	Наблюдается коагуляция
Гидролиз пептона	Положительный	Положительный
Гидролиз желатина	Слабый	Не определяют
Восстановление нитратов	Положительное	Отрицательное
Ассимиляция аммонийного азота	Не определяют	Положительная

Таблица 2

Состав эфирного масла штаммов *Eremothecium*

Компонент	Штаммы <i>E. ashbyi</i>	Штаммы <i>E. gossypii</i>	
		ВКМ F-3276	ВКМ F-1398
Гераниол	65,5...80,9%	31,5...58,8%	55,7...69,7%
Цитронеллол	6,0...11,4%	2,5...4,6%	0,3...3,0%
Нерол	1,8...3,4%	1,9...6,8%	0,1...1,1%
β-фенилэтанол	9,1...20,1%	44,0...57,4%	25,1...38,6%

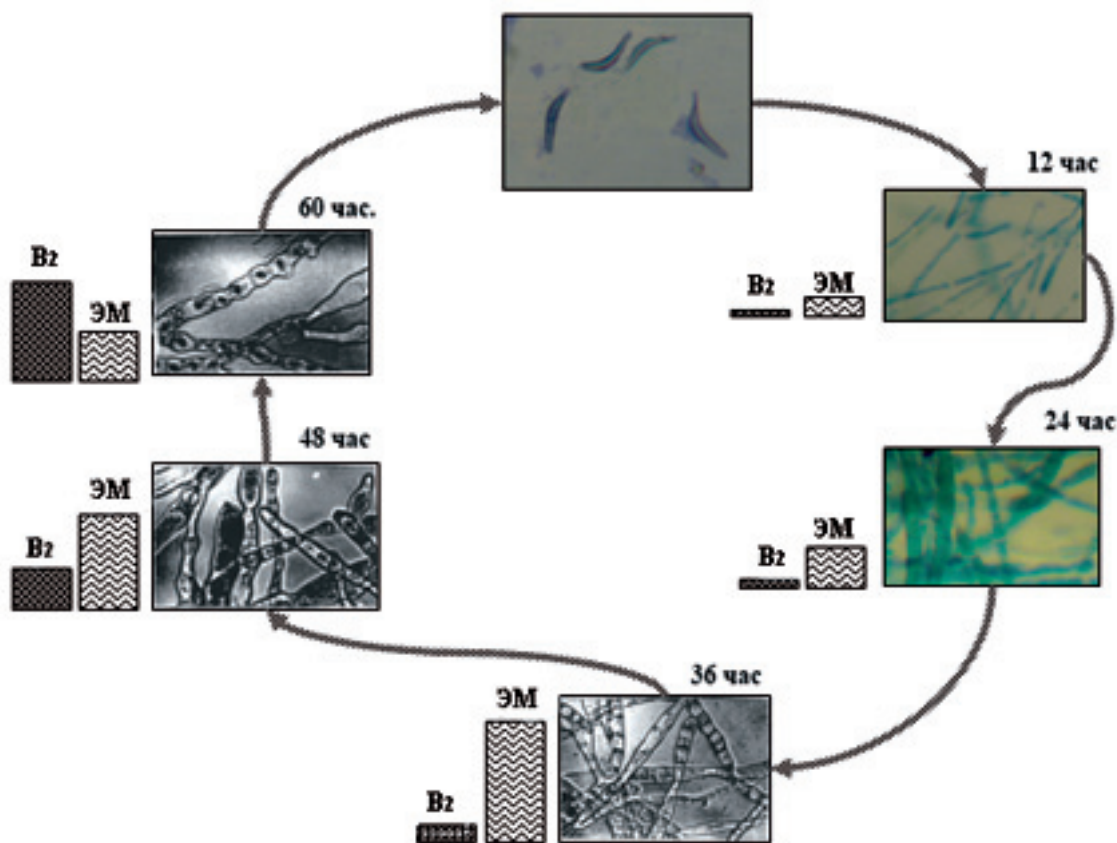
Динамика роста и развития в процессе культивирования

Динамика накопления биомассы *E. ashbyi* при культивировании в жидкой питательной среде подчиняется известным закономерностям для простых периодических культур: до 36 ч рост идет экспоненциально и достигает 2,0 г сухой биомассы на 1 л культуральной жидкости, затем наблюдается замедление

скорости роста, характерное при переходе к стационарной фазе, и к концу ферментации – началу автолиза культуры. При этом происходит сдвиг pH: закисление культуральной жидкости в период активного роста до 5,5 и увеличение pH до 6,2 в стационарную фазу и фазу лизиса. Синтез и накопление рибофлавина начинался в фазе стационарного роста и увеличивался по мере лизирования

культуры до 30 мг/г сухой биомассы. Максимум накопления основного монотерпенового спирта в составе эфирного масла гриба – гераниола – наступал в период между 36 и 48 ч культивирования и составил 25 мг/г сухой биомассы (рисунок). Аналогичным закономерностям подчиняется динамика роста

и развития штаммов *E. gossypii*. Продуктивность *E. ashbyi* в отношении синтеза эфирного масла при глубинном культивировании на соевой ферментационной среде составляет 99,8...141,1 мг/л, в то время как продуктивность *E. gossypii* – 565,5 мг/л ароматического продукта.



Динамика накопления эфирного масла и рибофлавина в онтогенезе *E. ashbyi* (периоды культивирования от момента прорастания аскоспор, час.; ЭМ – эфирное масло; B₂ – рибофлавин)

С особенностями биосинтетической активности коррелирует формирование и развитие некоторых клеточных структур. В вегетативных гифах суточной глубинной культуры присутствовали липидные тела. Количество их в динамике изменялось параллельно с уровнем накопления компонентов эфирного масла в культуральной жидкости. Выявленная вакуолизация мицелия отмечалась в период 36...48 часов культивирования. Активное спорообразование происходило в стационарной фазе изучаемых продуцентов (48...60 часов роста).

Наиболее продуктивным штаммом вида *E. ashbyi* является ВКМ F-3009, превосходящий по биосинтетической активности ВКМ F-124 в 1,4 раза, а рода *Ermothecium* – ВКМ F-3276, активность которого на 29...32 %

выше, чем ВКМ F-3009. Поэтому можно рекомендовать *E. gossypii* ВКМ F-3276 в качестве продуцента для биотехнологического получения натурального ароматического продукта, идентичного розовому эфирному маслу.

Выводы. Для видов *E. gossypii* и *E. ashbyi* не выявлено существенных отличий в микроморфологических показателях (форма, размеры клеток и т.п.) и в физиологических оптимумах (рН, температура, аэрация), а также в характере роста на различных питательных средах.

Определены культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности вида *E. gossypii*: имеет более мелкие по сравнению с *E. ashbyi* колонии, которые не становятся глянцевыми при культивиро-

вании свыше 3 суток, утилизирует в качестве единственного источника углерода и энергии целлюлозу и не усваивает цитраты.

Уровень накопления ароматобразующих веществ *E. gossypii* существенно выше, по сравнению с *E. ashbyi*, причем соотношение монотерпеновых спиртов более приближено к содержанию их в розовом эфирном масле.

Список литературы:

1. А.с. 1454845 СССР. Штамм гриба *Eremothecium ashbyi* ВКМФ-3009Д – продуцент эфирного масла / Семенова Е.Ф., Родов В.С., Бугорский П.С. (СССР) Заявл. 28.07.87. Опубл. 30.01.89, БИ № 4.
2. А.с. 1794948 СССР. Штамм гриба *Ashbya gossypii* ВКМФ – 3276Д – продуцент эфирного масла / Семенова Е.Ф., Бугорский П.С., Радзимовская С.Б. (СССР). Заявл. 23.08.90. Опубл. 15.02.93, БИ № 6.
3. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф., Родов В.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Eremothecium ashbyi* // Микробиологический журнал, 1990. – Т. 52. – № 3. – С. 44–47.
4. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом *Eremothecium ashbyi* (структурно-функциональные особенности) / А.Н. Погорельская, П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, Н.П. Бузулукова, Е.И. Горнунг // Вестник Российской академии с.-х. наук. – 2003. – № 1. – С. 83–85.
5. Получение и анализ эфирных масел при культивировании некоторых мицелиальных грибов / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, В.С. Родов и [др] // Основные направления исследований по интенсификации эфиромасличного производства: тезисы докладов Всесоюзного совещания. – Симферополь, 1985. – Ч. 2. – С. 51–52.
6. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
7. Семенова Е.Ф., Бугорский П.С. Некоторые итоги поиска биотехнологически перспективных ароматобразующих культур // Труды ВНИИ эфиромасличных культур. – Симферополь, 1989. – Т.20. – С. 14–16.
8. Семенова Е.Ф. *Eremothecium ashbyi* – перспективный продуцент для биотехнологии эфирных масел // VII съезд Украинского микробиологического общества (тезисы докладов). – Черновцы, 1989. – Ч. 1. – С. 126
9. Семенова Е.Ф., Бугорский П.С. Мицелиальные грибы – перспективные культуры для биотехнологического получения ароматических продуктов // V симпозиум «Основные направления научных исследований по интенсификации эфиромасличного производства»: тезисы докладов. – Кишинев, 1990. – С. 88–89.
10. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill // Известия вузов. Поволжский регион. – 2007. – Серия «Медицинские науки», № 4. – С. 44–50.

Рецензенты:

Иванов А.И., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии и экологии ФГОУ ВПО «Пензенская государственная сельскохозяйственная академия», Министерство сельского хозяйства РФ, г. Пенза;

Генгин М.Т., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГОУ ВПО «Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского» Министерство образования и науки РФ, г. Пенза.