Секція 1 БІОТЕХНОЛОГІЇ: ХАРЧОВА ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА, БІОТЕХНОЛОГІЯ У ТВАРИННИЦТВІ ТА ВЕТЕРИНАРІЇ, ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ, МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ БЕТА-КАРОТИНУ В МІЦЕЛІАЛЬНІЙ БІОМАСІ

І.М. Зубарева[1], І.В. Семененко[1], Н.Б. Мітіна[2]

[1]Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара
[2] Український державний хіміко-технологічний університет
ix@gmail.com

Промислове отримання природних каротиноїдів, в тому числі і бета-каротину, здійснюють біотехнологічним способом за допомогою сумісних статевих (+), (–) форм мукорового гетероталічного гриба *Blakeslea trispora*. Синтезовані грибом пігменти є ендометаболітами, тому одержуваний продукт представляє собою міцеліальну біомасу, що містить внутрішньоклітинний бета-каротин. Як у лабораторних, і у промислових умовах процеси мікробних синтезів, зокрема і синтезу каротиноїдів, супроводжуються обов'язковим оперативним контролем. Так, контроль за ходом ферментації здійснюється за такими режимними параметрами процесу, як кислотність живильного середовища та культуральної рідини (КР), температура культивування, рівень рідин, рівень піни в апараті, рівень аерації та перемішування КР. Найважливішим з режимних параметрів процесу є активність, тобто кількість бета–каротину в одиниці обсягу ферментаційної суміші [1].

Відомі різні способи визначення бета-каротину в біомасі, що містить каротиноїди. Як правило, кількісне визначення пігменту включає кілька послідовних операцій: відокремлення біомаси від рідкої фракції культуральної рідини, дезінтеграція клітин, екстракція каротину органічним розчинником та його спектрофотометричне визначення [1, 2]. Застосовувані на практиці прийоми виділення міцеліальної біомаси, руйнування клітин та екстракції каротину тривалі, трудомісткі та пов'язані з певними втратами. Тому описані в літературі методи визначення бета-каротину для виконання масових і численних аналізів не завжди зручні.

Метою даної роботи є вдосконалення відомих способів визначення бета-каротину в біомасі продуцента з метою спрощення, підвищення експресності і зниження ймовірності випадкових помилок на стадіях обробки біомаси.

Вирощування мукорового гетероталічного грибу IMB F-100019 *Blakeslea trispora* (Інститут мікробіології та вірусології НАН України, Київ) – продуцента бета-каротину проводили в кілька стадій. Робочу культуру отримували роздільним пересіванням (+), (–) штамів музейних косяків на свіже сусло-агарове живильне середовище та подальшим поверхневим вирощуванням протягом 7 діб. Маточну культуру отримували подальшим, також роздільним, пересіванням на рідкі живильні середовища в колби об'ємом 300 мл. Склад маточних живильних середовищ наступний (%): кукурудзяний екстракт – 13, зелена патока – 7. Час вирощування маточної культури становить три доби на мікробіологічних качалках УВМТ-12-250, що працюють зі швидкістю 220–240 об/хв. Отриманий (+), (–) маточний посівний матеріал переносили для спільного вирощування в ферментаційні колби об'ємом 300 мл. Співвідношення (+), (–) штамів для спільного культивування становить 4:1. Склад ферментаційних середовищ наступний (%): кукурудзяний екстракт – 6, зелена патока – 6, дигідрофосфат калію – 0,05, тіамін хлорид – 0,0002, рослинна олія – 4. Всі використовуван іживильні середовища піддавали термічнійстерилізації при 120 ^{0}С протягом 45 хвилин [2]. Тривалість ферментації становила 5 діб на мікробіологічній качалці УВМТ-12-250, що працює у вказаному вище режимі перемішування. Температура культивування на

всіх стадіях 24–26 ^{0}С. Після закінчення ферментації отриману культуральну рідину сепарували на центрифузі Т–23. Для цього пробу культуральної рідини, що містить біомасу гриба *Blakeslea trispora*, об'ємом 50 мл поміщали в спеціальну ємність з нержавіючої сталі [3] (h = 60 мм, d = 43 мм) з отворами діаметром 1,3 мм та паперовим фільтром «синя стрічка» і центрифугували 10 хв при 2500 об/хв.

Наважку біомаси від $22 \cdot 10^{-3}$ до $62 \cdot 10^{-3}$ г, взяту з точністю до 0,0002 г, тричі обробляли 3 мл рідкого азоту, додавали 15 мл суміші ацетону і чотирихлористого вуглецю у співвідношенні 8:1 і залишали в холодильнику. Потім вимірювали оптичну щільність екстрактів бета-каротину на спектрофотометрі СФ-4 при довжині хвилі 450 нм і товщині шару 1,0 см відносно суміші розчинників, що застосовуються. Визначали вміст бета-каротину методом стандарту та виражали у мкг на 100 мл культуральної рідини, кількість біомаси розраховували за відомою методикою [2]. Експеримент проводили у 25 повторах. Отримані результати опрацьовували методами математичної статистики [4].

Прийом виділення біомаси фільтруванням ферментаційної суміші у звичайних умовах через спеціальну сітчасту тканину пов'язаний із втратами і не забезпечує відтворюваності вологості міцелію, що відокремлюється. Тому розроблено умови сепарування ферментаційної суміші за допомогою її центрифугування у пробірках спеціальних конструкцій.

З метою з'ясування оптимальних умов центрифугування, що забезпечують максимальний поділ культуральної рідини на фракції біомаси та нативного розчину, виконано двофакторний експеримент. Змінними параметрами обрано прискорення та тривалість центрифугування, функцією відгуку служила вологість біомаси.

Виявлено, що при збільшенні тривалості центрифугування понад 7 хв і прискоренні понад 2000 об/хв. вологість біомаси практично не зменшується. Тому як оптимальні значення цих параметрів вибрано 10 хвилин та 2500 об./хвилину. Випадкові коливання зазначених значень параметрів не впливають на ефективність розділення культуральної суміші.

Для вилучення бета-каротину із біомаси, її зазвичай розтирають у агатовій ступці з абразивним матеріалом (кварцовий пісок, подрібнене скло). Повного вилучення каротину за такої обробки досягти не вдається, що пояснюється особливостями будови грибної клітини та локалізацією у ній каротину [1].

Одним із найбільш ефективних способів руйнування біомас вважається швидке заморожування, наприклад, рідким азотом [1]. При такій низько-температурній обробці біомаса гриба піддається деструкції відразу після центрифугування, що виключає попереднє сушіння біомаси перед розтиранням і екстракцією. Бета-каротин екстрагується з оброблених азотом зразків органічними розчинниками без будь-якої додаткової обробки. Найбільш ефективна екстракція забезпечується сумішшю ацетону та чотирихлористого вуглецю у співвідношенні 8:1, відповідно.

Виявлено, що залежність максимуму поглинання різних екстрактів бета-каротину від довжини хвилі за загальноприйнятою методикою складає 0,75 мг/мл, відповідно ж запропонованому способу в суміші ацетону і чотирьоххлористого вуглецю в соотношении 8:1 дорівнює 0,87 мг/мл. Це свідчить про значно більш високий рівень екстрагування каротину саме запропонованим методом.

Таким чином, запропоновано вдосконалений метод кількісного аналізу бета-каротину в біомасі гриба - продуцента, що відрізняється простотою, мінімальністю та досить високою точністю. Метод рекомендовано використовувати для проведення масових аналізів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bondar I.V., Gulyaev V.M. // Promislova microbiology. Kharchova and agrobiotechnology. Dniprodzerzhynsk, DDTU publishing house, 2014. 280 .

2. Bakulina O. N., Nekrasova T. E. Criteria quality of carotenoids // Oil and fat industry. 2011. 3: 10-12.

3. Kudryavtsev V.V. // Modern Scientific Bulletin. Series: Engineerings ciences. 2014. 34 (230): 5-10.

4. Platonov A. E. Statistical analysis in medicine and biology. M: RAMS, 2010. 52.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ УБІХІНОНУ Q10 ДЛЯ ТЕРАПІЇ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ХВОРОБ

Є.Р. Франчук

Національний технічний університет «ХПІ»
Yehor.Franchuk@ihti.khpi.edu.ua

Мітохондріальні хвороби можуть бути як спадковими, так і наслідком дії сильного стресового фактору. Такий фактор спричиняє активацію білків-каналів, через які в цитоплазму виходить цитохром-С, який призводить до ряду біохімічних змін, що ведуть до каскаду касказ, а останні – до апоптозу. В здоровому стані організм має багаторівневу захисну систему, що не дозволяє перейти клітині до стану латентної фази апоптозу [1, 2].

Крім того, мітохондрії відіграють важливу роль в імунітеті людини. Явище нетозу характеризується вибухом клітини з вивільненням мітохондріальної ДНК, завдяки чому утворюються нейтрофільні пастки, які слугують таргетною точкою для лімфоцитів. З цього моменту розпочинається запальна реакція. Імунна система знешкоджує залишки мітохондрії та клітини, що її містила, тому в цей час вона не здатна реагувати на інші чужорідні агенти. Особливо цей ефект помітний при гострих інфекційних хворобах. Для протидії цьому явищу, з одного боку, необхідно блокувати канал вивільнення цитохрому-С, що робиться на різних рівнях. Сьогодні немає препарату, який дозволив би повністю вирішити цю проблему. З іншого боку, можна зупинити деякі сигнали на рівні перехресного окиснення ліпідів. Таким чином, вітаміни та інші антиоксидантні, фармацевтично активні інгредієнти застосовуються у боротьбі з дисфункцією мітохондрій [2, 3].

Мітохондріальні спадкові хвороби передаються виключно по материнській лінії, хоча були одиничні повідомлення про спадкування від батька. Ці хвороби характеризуються неспроможністю повністю задовольнити енергетичні потреби, тому страждають, в основному, м’язові та нервові тканини. Фенотипічний прояв залежить від співвідношення здорових мітохондрій і з дисфункцією, тому спостерігається неоднорідність серед клітин однієї тканини. В даному випадку блокуються гени, що відповідають за синтез тих чи інших білків, серед яких ферменти ланцюгу переносу електронів [3].

Терапія при міопатіях і нейропатіях заснована на застосуванні вітамінів, що виступають простетичними групами або коферментами транспортних білків. Можуть блокуватися гени, що відповідають за синтез ферментів, які беруть участь в окисному декарбоксилюванні пірувату та бета-окисленні жирних кислот. Виходячи з вище згаданого, в терапії мітохондріальних хвороб використовують фармацевтичні препарати та харчові добавки на основі тиміну (вітаміну В1), рибофлавіну (вітаміну В2), біотину (вітаміну В7), убіхінону (коензиму Q10), нікотинової кислоти (вітаміну РР або В3) тощо. Терапевтична дія тиміну поки не була доведена [3].

Наразі єдиним комерційним препаратом, за допомогою якого лікують мітохондріальні хвороби (зокрема, спадкову зорову нейропатію), є ідебенон від Raxone. Це синтетичне похідне від убіхінону Q10, який має скорочений ланцюг і володіє поліпшеною розчинністю та фармакокінетикой [3].

Таким чином, питання оптимізації виробництва убіхінону Q10 являється актуальним.