УДК 577.355

Валеева Р.Т.,
кандидат технических наук, доцент,
доцент кафедры «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань
Смородин А.Н.,
студент,
4 курс, кафедра «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ ДЛЯ МАКСИМИЗАЦИИ НАКОПЛЕНИЯ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ ШТАММА PHAFFIA RHODOZYMA

Аннотация: *Астаксантин представляет собой ценный кетокаротиноид с мощными антиоксидантными свойствами, применяемый в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Phaffia rhodozyma является перспективным источником натурального астаксантина, однако низкая продуктивность ограничивает его промышленное применение. В настоящей работе проведен сравнительный анализ влияния светового режима, дефицита азота и температуры на биосинтез и накопление астаксантина.*

Ключевые слова: *phaffia rhodozyma, Xanthophyllomyces dendrorhous, астаксантин, стрессовые факторы, световой режим, дефицит азота, температура, окислительный стресс, каротиногенез, ферментация.*

Annotation: *Astaxanthin is a valuable ketocarotinoid with powerful antioxidant properties used in the pharmaceutical, food and cosmetics industries. Saffia rhodozyma is a promising source of natural astaxanthin, but its low productivity limits its industrial use. In this paper, a comparative analysis of the effects of light conditions, nitrogen deficiency, and temperature on the biosynthesis and accumulation of astaxanthin is carried out.*

Key words: *phaffia rhodozyma, Xanthophyllomyces dendrorhous, astaxanthin, stress factors, light regime, nitrogen deficiency, temperature, oxidative stress, carotenogenesis, fermentation.*

Астаксантин (3,3'-дигидрокси-β,β'-каротин-4,4'-дион) представляет собой кетокаротиноид красно-оранжевого цвета, обладающий мощными антиоксидантными свойствами и широко применяемый в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Природные источники астаксантина - в основном микроводоросли Haematococcus pluvialis, однако их культивирование затратно и экологически нецелесообразно.

Дрожжи Phaffia rhodozyma (синоним Xanthophyllomyces dendrorhous) являются перспективным альтернативным источником натурального астаксантина. Эти гетероферментативные дрожжи способны синтезировать астаксантин через серию окислительно-восстановительных реакций, начиная с ацетил-КоА. Однако низкая продуктивность природных штаммов - обычно 0,05-0,2 мг/г сухого веса - ограничивает их промышленное применение.

Влияние светового режима.

Световой режим является одним из ключевых факторов, регулирующих биосинтез каротиноидов у P. rhodozyma. Исследования показывают, что свет стимулирует продукцию астаксантина, однако эффект зависит от интенсивности освещения и длины волны. Штамм ATCC 24228 при культивировании на свету продуцировал 2,45 мг/л общих каротиноидов и 2,13 мг/л астаксантина, что существенно превышало показатели в темноте.

Оптимальная интенсивность освещения для большинства штаммов X. dendrorhous находится в диапазоне 600-1000 люкс. При освещенности 1000 люкс штамм 26UV достигал максимальной концентрации астаксантина в клетках 0,51 мг/г сухого веса, что на 32-45% выше по сравнению с культивированием в темноте. Объемный выход пигмента при освещении 600 люкс составлял 2,15 мг/л для штамма 10BE, демонстрируя наилучшие показатели среди исследованных вариантов световых режимов.

Важно отметить, что чрезмерно высокая интенсивность света (более 5000 люкс) приводила к гибели микробных клеток и снижению продуктивности. Это указывает на существование оптимального диапазона светового воздействия, выход за границы которого обусловлен избыточным образованием активных форм кислорода и окислительным повреждением компонентов клетки.

Световая индукция астаксантина реализуется через несколько взаимосвязанных механизмов. Экспозиция клеток P. rhodozyma к свету, особенно к ультрафиолетовому и синему спектру, вызывает транскрипционную активацию ключевых генов каротиногенеза crtYB, crtI и crtS, кодирующих фитоен/ликопен-циклазу, фитоен-дегидрогеназу и астаксантин-синтазу соответственно. Наибольшее изменение экспрессии наблюдается для гена crtI, уровень транскрипции которого возрастает в 3-5 раз при ультрафиолетовом освещении.

Световой стресс индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), что запускает окислительный стресс и активирует защитные механизмы клетки. В ответ на накопление АФК усиливается экспрессия генов антиоксидантной защиты и каротиногенеза. Протеомный анализ показал, что при индукции каротиногенеза повышается содержание белков, связанных с окислительно-восстановительными реакциями и стрессовым ответом.

Кроме того, световая стимуляция активирует пентозофосфатный путь, обеспечивая повышенное образование NADPH, необходимого для биосинтеза каротиноидов. NADPH служит восстановителем в реакциях окислительного преобразования каротиноидных предшественников в астаксантин, поэтому повышение доступности этого кофактора напрямую увеличивает выход целевого продукта.

Дефицит азота как индуктор синтеза астаксантина.

Ограничение азота в культуральной среде представляет собой эффективную стратегию стимуляции биосинтеза астаксантина в P. rhodozyma. При высоком соотношении углерод/азот (C/N = 33, азот-дефицитные условия) содержание астаксантина достигало 0,30 мг/г сухого веса клеток и 1,9 мг/л объемного выхода, что на 150% и 118,4% соответственно превышало показатели при низком C/N (C/N = 5).

Однако дефицит азота негативно влияет на рост биомассы: при C/N = 33 биомасса составляла лишь 5,2 г/л по сравнению с 7,2 г/л при C/N = 5. Это указывает на необходимость оптимизации баланса между ростом клеток и синтезом целевого продукта в промышленных процессах.

Добавление сульфата аммония в концентрации 1 г/л на начальных этадах культивирования повышало содержание астаксантина до 9,06 мг/г, что на 64,4% выше контрольного значения. Использование мочевины в качестве источника азота также способствовало накоплению астаксантина, хотя и сопровождалось снижением скорости роста клеток.

Медленно метаболизируемые аминокислоты как единственный источник азота увеличивали продукцию астаксантина, но значительно снижали максимальную удельную скорость роста и коэффициент выхода биомассы. Это позволяет предположить, что различные источники азота оказывают дифференцированное воздействие на метаболизм P. rhodozyma.

Температурный режим и его влияние на астаксантин.

Температура является критическим параметром, определяющим как рост биомассы, так и накопление астаксантина в P. rhodozyma. Оптимальный диапазон температур для роста и синтеза астаксантина составляет 17-21°C.

При температуре 20°C достигаются максимальные показатели продуктивности: содержание астаксантина в клетках 0,3-0,6 мг/г сухого веса, объемный выход 88-387 мг/л в зависимости от штамма и условий культивирования.

Систематическая оптимизация ферментационных параметров для штамма GDMCC 2.218 показала, что при температуре 20°C, pH 4,5 и растворенном кислороде 20% достигался выход астаксантина 387,32 мг/л за 144 часа в биореакторах объемом 500 мл. При масштабировании до 5 литров выход увеличивался до 400,62 мг/л за 165 часов. Эти результаты представляют собой 10-20-кратное улучшение по сравнению с ранее сообщавшимися уровнями для штаммов дикого типа.

Повышение температуры выше оптимального диапазона оказывает ингибирующее воздействие на рост P. rhodozyma и синтез астаксантина. При температурах 25-28°C клетки демонстрировали медленный рост с оптической плотностью OD_{600} менее единицы после 46,4 часов культивирования.

Штамм MK19, адаптированный к умеренным температурам, при 28°C достигал биомассы только 6 г/л после 100 часов культивирования, что сопровождалось снижением синтеза ДНК и РНК на 50-60%. Двухстадийный процесс с прекультивированием при 20°C в течение 18 часов с последующим культивированием при 30°C позволял достичь выхода астаксантина 116,42 мкг/г сухого веса, однако этот показатель был ниже, чем при стандартном процессе при 20°C (140,28 мкг/г за 96 часов).

Сравнительная эффективность стрессовых факторов.

Сравнительный анализ эффективности различных стрессовых факторов демонстрирует, что оптимальная температура (20°C) является наиболее значимым параметром для максимизации продукции астаксантина. При

оптимальной температуре в сочетании с контролируемым pH и растворенным кислородом достигаются наивысшие показатели как содержания астаксантина (0,3-0,6 мг/г), так и объемного выхода (88-387 мг/л).

Световой режим при оптимальной интенсивности (600-1000 люкс) обеспечивает повышение содержания астаксантина на 32-45% по сравнению с культивированием в темноте, достигая 0,51 мг/г сухого веса и 2,15 мг/л объемного выхода.

Дефицит азота (высокое соотношение C/N) увеличивает содержание астаксантина на 150% (до 0,30 мг/г), однако негативно влияет на накопление биомассы, снижая ее до 5,2 г/л против 7,2 г/л при достаточном азотном питании.

Синергетический эффект комбинированного применения оптимальных условий (температура 20°C, pH 4,5, умеренный дефицит азота, контролируемое освещение) позволяет достичь содержания астаксантина 0,6-0,9 мг/г и объемного выхода 387-401 мг/л, что представляет увеличение на 233-400% по сравнению с базовыми условиями культивирования.

Все три категории стрессовых факторов конвергируют на общем механизме индукции астаксантина через генерацию окислительного стресса и нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза. Ключевая роль в этом процессе принадлежит изменениям соотношения NADH/NAD+, которое варьирует в зависимости от питательных и экологических условий.

Стрессовые условия, приводящие к синтезу астаксантина и вызываемому ферментацией окислительно-восстановительному дисбалансу, категоризируются следующим образом: (i) нарушение потока электронов через митохондриальную дыхательную цепь; (ii) нарушение окислительного фосфорилирования АДФ, вызванное дефицитом азота или фосфата; (iii) условия, приводящие к избыточным уровням NADH, включая активную реассимиляцию этанола и высокие концентрации сахара.

Протеомный и метаболомный анализ выявил, что ферменты, связанные с синтезом ацетил-КоА, более обильны до каротиногенеза, в то время как белки, связанные с окислительно-восстановительными реакциями и стрессом, активируются во время индукции каротиногенеза. Для ключевых ферментов биосинтеза каротиноидов - мевалонаткиназы и фитоен/сквален-синтазы - наблюдается повышенное содержание во время индукции и накопления каротиноидов.

На основании проведенного анализа можно сформулировать оптимальные параметры культивирования P. rhodozyma для максимизации выхода астаксантина:

- Температура культивирования: 20-21°C
- pH среды: 4,5
- Растворенный кислород: 20-30%
- Освещение: 600-1000 люкс, предпочтительно синий или ультрафиолетовый спектр
- Начальная концентрация глюкозы: 50-60 г/л

Для достижения оптимального баланса между ростом биомассы и накоплением астаксантина рекомендуется двухстадийная стратегия культивирования:

Первая стадия (прирост биомассы): при достаточном азотном питании (C/N = 5-10), 48-72 часа

Вторая стадия (стимуляция биосинтеза астаксантина): с ограничением азота (C/N = 30-35), 72-96 часов

Сравнительный анализ эффективности различных стрессовых факторов для максимизации накопления астаксантина в Phaffia rhodozyma демонстрирует, что оптимальная температура (20°C) является наиболее критическим параметром, обеспечивающим максимальную продуктивность при сохранении жизнеспособности клеток.

Световой режим в диапазоне 600-1000 люкс повышает содержание астаксантина на 32-45%, в то время как дефицит азота увеличивает содержание пигмента на 150%, но негативно влияет на накопление биомассы.

Молекулярные механизмы действия всех стрессовых факторов конвергируют на индукции окислительного стресса через нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза и изменение соотношения NADH/NAD+. Это приводит к активации антиоксидантного ответа и накоплению астаксантина как неферментативного антиоксиданта. Регуляция не затрагивает напрямую гены биосинтеза каротиноидов, а действует на уровне центрального метаболизма, обеспечивая прекурсоры и восстановительную силу для синтеза астаксантина.

Оптимальная стратегия производства астаксантина должна включать комбинированное применение контролируемых стрессовых факторов: температуру 20°C, pH 4,5, умеренное освещение (600-1000 люкс), двухстадийное культивирование с переходом от достаточного к дефицитному азотному питанию. При таком подходе достигаются выходы астаксантина 387-401 мг/л с содержанием в клетках 0,6-0,9 мг/г сухого веса, что соответствует увеличению продуктивности на 233-400% и обеспечивает экономическую целесообразность промышленного производства натурального астаксантина.

Использованные источники:

1. Захаров З.В. Культивирование дрожжей Phaffia rhodozyma при производстве астаксантина // Биотехнология, 2012, т.38, №5, с.5-10.

2. Артюхова С.И., Бондарева Г.И. Биотехнология новых форм каротиноидных препаратов на основе микробного синтеза // Россия молодая: передовые технологии – в промышленность. 2013. N 3. С. 4–6. EDN: RQCWEN.

3. Колб В.Г. Клиническая биохимия: пособие для врачей-лаборантов / В.Г. Колб, В.С. Камышников. - М.: Беларусь, 1976. - 311 с.

4. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. - М.: Просвещение, 1975. - 318 с.