

УДК 604.4+606

БИОТЕХНОЛОГИИ ГРИБНЫХ АРОМАПРОДУКТОВ**Е.Ф. Семенова**

Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия
Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

Душистые вещества широко применяют в качестве ароматизаторов для пищевых, парфюмерных, косметических, фармацевтических продуктов и товаров бытовой химии. Их получают из сравнительно небольшого числа ботанических видов, отличительной особенностью которых является способность к биосинтезу и накоплению эфирных масел. Одним из растений, дорогостоящее масло которого высоко ценят во всем мире на протяжении тысячелетий, является роза (*Rosa L.*). Однако существующие производства розового масла не способны удовлетворить в полном объеме увеличивающийся спрос отечественной промышленности на натуральные душистые вещества. При использовании культуры клеток розы накопление масел ниже на порядок, чем в лепестках интактного растения, и их состав отличается от традиционного розового масла [1].

В 80–90-е годы XX века была показана возможность получения ароматических соединений с помощью микроорганизмов, в частности, грибов [2–4]. Проведенные ранее исследования показали, что *Eremothecium ashbyi* Guillermond 1935 и *Eremothecium gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним *Ashbya gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guillermond 1928) способны выделять в окружающую среду близкое к розовому эфирное масло [5–7].

Цель работы – поиск новых продуцентов и разработка биотехнологии аромапродуктов с запахом розы эфирномасличной на основе селекционных штаммов микроскопических грибов.

Основными объектами исследования служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guillermond 1935 VKM F124, VKM F1397, VKM F3009, VKM F4565Д, VKM F4566Д, VKPM F6, VKPM F36, VKPM F340, VKPM F1320Д и *Eremothecium gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним *Ashbya gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guillermond 1928) VKM F1398, VKM F2627, VKM F3276, VKM F3296, VKPM F35, VKPM F1321Д. Кроме того, детально изучали полученные в ходе экспериментальной работы их морфо- и хемовары. Видовая принадлежность культур была подтверждена на кафедре микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов молекулярно-генетическим анализом.

Также исследовали штаммы и выделенные из естественных местообитаний изоляты, полученные из Института ботаники имени Н.Г. Холодного, Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного, ВНИИ пищевой биотехнологии, ВНИИ пищевых ароматизаторов, кислот и красителей, в частности, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. vini*, *S. rosei*, *Kluveromyces spp.*, *Sporobolomyces odoratus*, *Endomycopsis fibuligera*, *E. bispora*, *Aspergillus terreus*, *A. oryzae*, *A. awamori* 120–177, *A. foetidus* M-45, *Penicillium rubrum*, *P. canescens* 20–171, *P. solitum*, *Ceratocystis courulescens*, *C. variospora*, *C. moniliformis*, *C. paradoxa*, *C. pilifera*, *Trichoderma viride*, *Agaricus bisporus* IBK 459, *Lentinus edodes*; *Pleurotus ostreatus* Kum. IMV F1300, VKM F2008 (IBK 109) и др.

Исследования с продуцентами ароматообразующих соединений проводили по следующей схеме (рис. 1).

Выделение ароматообразующих соединений осуществляли методами экстракции и дистилляции. Для количественного определения эфирного масла использовали методику, предложенную в Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ XIV издания, 2018). Определение компонентного состава извлеченного масла проводили на хроматографах «Хром-5», «Кристалл 2000М», PerkinElmerClarus 680 с пламенно-ионизационным детектором на полярной колонке [8]. Математическую обработку данных проводили с помощью статистической программы STATISTICA 10.0 при уровне значимости $P = 0,95$ [9].

Наиболее перспективными с целью получения эфирных масел и летучих душистых соединений с разнообразными направлениями запаха являются культуры базидиомицетов и аскомицетов, в том числе дрожжей, поскольку они способны накапливать промышленно важные и биологически активные метаболиты (табл. 1). Осуществленный направленный поиск перспективных объектов для биотехнологии ароматических продуктов в пределах родов *Trichoderma*, *Ceratocystis*, *Aspergillus*, *Eremothecium* и др. дал возможность охарактеризовать различия между видами, штаммами по уровню биосинтетической активности и составу эфирного масла [10].



Рисунок 1. Алгоритм исследования продуцентов ароматообразующих соединений

Наибольший интерес с целью получения эфирного масла представляют виды родов *Ceratocystis*, *Trichoderma*, *Eremothecium*, *Pichia*, *Saccharomyces*. Среди основных направлений запаха синтезируемых микромицетами летучих душистых соединений можно выделить цветочный, причем преобладает аромат розы, который обеспечивается у большинства продуцентов только за счет фенилэтилового спирта. Однако *Ceratocystis* sp., *Eremothecium* sp. и *Kluuveromyces* sp. способны также синтезировать монотерпеновые спирты: гераниол, цитронеллол, нерол, линалоол, фарнезол, являющиеся главными компонентами розового эфирного масла. Кроме того, многие микроскопические грибы способны синтезировать такие душистые вещества с фруктовым запахом, которые относятся не только к классу сложных эфиров, как в случае с бактериями, но и к более сложным в отношении химического строения соединениям – лактонам. Хотя лактоны также производятся химической промышленностью, однако использование микроорганизмов имеет ряд преимуществ, особенно, если необходимо получить оптически активные соединения. *Trichoderma viride* способна генерировать сильный кокосовый аромат при росте на простой питательной среде, который обусловлен в большей степени синтезом 6-пентил-2-пирона в количестве 170 мг на л культуральной жидкости. Химический синтез этого соединения является 7-стадийным, что усложняет и удорожает промышленное производство. Персиковый аромат может быть получен при использовании культуры *S. odorus*, продуцента 4-декалактона.

Однако грибы, в большей степени базидиомицеты, представляет также интерес как продуценты летучих душистых веществ с «грибным» ароматом, который обусловлен алифатическими 8-углеродными соединениями (1-октен-1-ол, 1-октен-3-он, 1-октен-3-ол, 3-октанол и др.), некоторыми пиразинами и пирролами. Таким образом, при глубинном культивировании они могут быть использованы в производствах пищевой промышленности для получения натуральных ароматизаторов с грибным запахом. Уровень накопления ароматообразующих соединений, синтезируемых грибами, значительно варьирует от сотен мкг (*S. populina*) до сотен миллиграмм (*S. variospora*, *S. moniliformis*, *E. asbyi*, *E. gossypii*, *T. viride*) на л культуральной жидкости [11, 12]. Одни из самых высоких показателей были отмечены у *E. ashbyi*. Синтез эфирного масла коллекционными штаммами *E. ashbyi* достигает 180 мг на л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что может быть сопоставлено с содержанием эфирного масла в 500–600 г. цветков розы. Причем лучшие показатели по отношению максимального уровня накопления ароматообразующих соединений ко времени ферментации были достигнуты именно у аскомицетов родов *Ceratocystis* и *Eremothecium* (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты оценки некоторых исследованных видов грибов, синтезирующих душистые вещества

Таксономическое положение	Синтезируемые летучие вещества	Запах	Уровень накопления ароматического продукта, мг/л
<i>Agaricus bisporus</i> (<i>Agaricaceae</i>)	3-метилбутаналь, 3-октанон, 1-октен-3-он, 3-октанол, 1-октен-3-ол, фурфураль, бензальдегид, фенилацетальдегид, бензиловый спирт	сильный грибной	70,3–230,0
<i>Lentinus edodes</i> (<i>Polyporaceae</i>)	лентионин, 1-октен-3-ол, 1-октен-3-он	грибной	46,7–101,9
<i>Pleurotus ostreatus</i> (<i>Pleurotaceae</i>)	1-октен-3-ол, 1-октен-3-он	грибной	95,3 -210,4
<i>Sporobolomyces roseus</i> (<i>Sporidiobolaceae</i>)	4-декалактон	персиковый	27,5–156,4
<i>Aspergillus oryzae</i> (<i>Trichocomaceae</i>)	1-октен-1-ол	ананасовый	24,3–61,8
<i>Ceratocystis variospora</i> (<i>Ophiostomataceae</i>)	цитронеллол, цитронеллилацетат, гераниаль, нераль, гераниол, линалоол, геранилацетат, нерол, α -терпинеол	ароматный, подобный герани	100,0–240,0
<i>Trichoderma viride</i> (<i>Hypocreaceae</i>)	6-пентил-2-пирон, 6-(пент-1-енил) – 2-пирон	кокоса	170,2–370,7
<i>Eremothecium ashbyi</i> (<i>Eremotheciaceae</i>)	гераниол, цитронеллол, нерол, β -фенилэтиловый спирт, линалоол, цитраль, фарнезол	подобный розе	99,8–480,0
<i>Eremothecium gossypii</i> (<i>Eremotheciaceae</i>)	гераниол, цитронеллол, нерол, β -фенилэтиловый спирт, линалоол, цитраль, фарнезол	подобный розе	156,9–565,5
<i>Kluyveromyces lactis</i> (<i>Saccharomycetaceae</i>)	цитронеллол, гераниол, линалоол, β -фенилэтанол, эфиры, изоамиловый спирт, ацетонин, 2-фенилацетат, изобутанол, изовалериановая кислота	фруктовый, подобный розе, цветочный	42,5–95,9
<i>Saccharomyces rosei</i> (<i>Saccharomycetaceae</i>)	β -мирцен, лимонен, линалоол, α -терпинеол, фарнезол	цветочный, цветочно-фруктовый	36,4–72,6

Проведенные нами исследования по биоконверсии отходов эфирномасличного производства, включающие изучение состава отходов, разработку способов их подготовки, выбор микроорганизмов-биотрансформаторов, показали, что утилизация твердых отходов переработки лаванды, розы, шалфея, мяты, сельдерея, укропа, кориандра практически не зависит от видовой принадлежности базидиомицетов. Однако имеется тенденция к штаммовой специфичности биотрансформаторов (табл. 2). Высокой скоростью роста грибницы вешенки и шампиньона обладали на кориандровом шроте и отходах шалфея мускатного после экстракции: в течение 1 недели гифы пронизывали весь субстрат. Следует отметить высокий уровень накопления октен-3-ола (основного компонента, обуславливающего запах съедобных грибов) при культивировании штамма *Pleurotus ostreatus* ВКМ F-2008 на кориандровом шроте, подтвержденный органолептической оценкой культур. Изученные штаммы базидиомицетов в глубинной культуре также накапливали большие количества биомассы, например, биомасса штамма *P. ostreatus* ИМВ F1300 в течение 6 суток достигала 16 г./л. Однако, уровень накопления ароматообразующих соединений прямо зависел от этого показателя: штаммом *Agaricus bisporus* ИБК 459 в течение 3 суток при биомассе 2,34 г./л синтезировалось 30,0 мг/л эфирного масла, а через 6 суток при биомассе 11,86 г./л образовалось 41,4 мг/л эфирного масла и 262,0 мг/л экстракта.

В процессе глубинного культивирования *E. ashbyi*, *E. gossypii*, *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *Entomophthora virullenta* на вытяжке кориандрового шрота наблюдали рост их мицелиальной массы и синтез вторичных соединений (пигментов, рибофлавина, душистых соединений), интенсивность которых носила видо- и штаммоспецифичный характер (табл. 3).

Таблица 2 – Биосинтетическая активность базидиомицетов при твердофазном культивировании

Субстрат	Штамм	Выход ЭЭ, мг/кг субстрата	Выход октен-3-ола, мг/кг субстрата	Содержание октен-3-ола, % в ЭЭ
<i>Pleurotus ostreatus</i>				
КШ	ИМВ F1300	90	70	77,7
ОШЭ	ИМВ F1300	580	570	98,2
КШ	ВКМ F2008	2230	2080	93,5
ОШЭ	ВКМ F2008	1450	1380	95,1
<i>Agaricus bisporus</i>				
КШ	ИБК 459	202	170	84,1
ОШЭ	ИБК 459	490	420	85,7
Примечание. ЭЭ – эфирный экстракт, КШ – кориандровый шрот, ОШЭ – отходы шалфея после экстракции.				

Таблица 3 – Накопление летучих душистых веществ штаммами *E. ashbyi* и *E. gossypii* в процессе глубинного культивирования на средах, в которых источники азота заменены кориандровым шротом

Штамм	Среда хранения	Ферментационная среда	Источник азота, замененный КШ	Содержание эфирного масла, мг/л			
				в фильтрате		в КЖ	
				среда с КШ	контроль	среда с КШ	контроль
<i>E. gossypii</i>							
ВКМ F2627	КДА	ГПД	пептон, ДЭ	4,18	5,58	4,38	13,09
ВКМ F2627	СА	ГПД	пептон, ДЭ	2,60	2,93	5,85	4,67
ВКМ F3276	КДА	ГПД	пептон, ДЭ	2,53	6,25	6,51	13,59
ВКМ F3276	СА	ГПД	пептон, ДЭ	5,85	34,76	6,61	25,39
ВКМ F3276	КДА	СС	соевая мука	4,09	6,37	5,95	26,74
ВКМ F3276	СА	СС	соевая мука	23,33	39,85	39,52	48,57
<i>E. ashbyi</i>							
ВКМ F3009	СА	СС	соевая мука	61,10	63,43	65,34	84,69
ВКПМ F340	СА	СС	соевая мука	20,68	37,96	46,38	68,14
Примечание. КШ – кориандровый шрот, КЖ – культуральная жидкость, КДА – картофельно-декстрозный агар, СА – сусло-агар, ГПД – глюкозо-пептонная среда с дрожжевым экстрактом, СС – соево-сахарозная среда, ДЭ – дрожжевой экстракт							

Результаты исследования свидетельствуют о том, что кориандровый шрот может использоваться грибными культурами в качестве единственного источника углерода и азота или только единственного источника азота. Это указывает на возможность полной или частичной замены кориандровым шротом соевой муки в производственной ферментационной среде для получения ароматообразующих соединений на основе микробного синтеза.

С целью изучения возможности получения дополнительных ароматических продуктов были проведены поисковые работы на существующих микробиологических производствах. Анализ липофильных соединений в образцах культуральной жидкости, сточных вод, летучих душистых веществ в газовых выбросах производственных штаммов, относящихся к видам *Endomycopsis fibuligera*, *E. bispora*, *P. canescens*, *P. solitum*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. orizae* и др., свидетельствуют о довольно высокой биосинтетической активности (до 450 мг/л у *A. awamori*). Парфюмерная оценка новых ароматических продуктов позволила выделить перспективные: фруктово-цветочного направления – *Aspergillus* spp., с запахом кокосового молока – *T. viride*. Таким образом, показанное разнообразие ароматообразующих грибов подчеркивает их важную роль как альтернативных источников эфирных масел, индивидуальных летучих душистых соединений при возможном внедрении биотехнологий на их основе в промышленное производство натуральных ароматизаторов.

Полученные результаты позволяют выделить виды *Ceratocystis*, *Eremothecium*, *Trichoderma*, *Kluveromyces* как наиболее перспективные продуценты ароматообразующих веществ с фруктовым и цветочным ароматами, отличающиеся высокими скоростью роста и уровнем накопления душистых соединений. Причем эфирные масла, синтезируемые представителями рода *Eremothecium*, представляют большую ценность, так как по компонентному составу наиболее приближены к розовому, одному из самых востребованных на мировом рынке, эфирному маслу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова, Н.А. Некоторые итоги и перспективы биотехнологических исследований эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Эфиромасличные растения и лекарственные растения. Научные труды Института эфиромасличных и лекарственных растений Украинской академии аграрных наук. – 2006. – Выпуск 26. – С. 19–26.
2. Production of flavours by microorganisms / L. Janssens, H.L. De Pooter, N.M. Schamp, E.J. Vandamme // Process Biochemistry. – 1992. – V. 27. – P. 195–215.
3. Krings, U. Biotechnological production of flavours and fragrances / U. Krings, R.G. Berger // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 49. – P. 1–8.
4. Demain, A.L. Metabolites, Primary and Secondary / A.L. Demain // Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalyst and Boiseparation. Eds. M.C. Flickinger, S.W. Draw. – Wiley Interscience, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 1999. – V. 3. – P. 1713–1732.
5. Бугорский, П.С. Состав эфирного масла мицелиального гриба *Eremothecium ashbyi* / П.С. Бугорский, В.С. Родов, А.М. Носов // Химия природных соединений. – 1986. – № 6. – С. 790–791.
6. Бугорский, П.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Eremothecium ashbyi* / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, В.С. Родов // Микробиологический журнал. – 1990. – Т. 52, № 3. – С. 44–47.
7. Бугорский, П.С. Душистые вещества мицелиального гриба *Ashbya gossypii* / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова // Химия природных соединений. – 1991. – № 3. – С. 428.
8. Гуринович, Л.К. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение / Л.К. Гуринович, Т.В. Пучкова. – М.: Школа Косметических Химиков, 2005. – 192 с.
9. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов. – М.: Из-во РАМН, 2000. – 52 с.
10. Семенова, Е.Ф. Некоторые результаты биотехнологии ароматических продуктов / Е.Ф. Семенова, Н.И. Богданов // Сб. трудов «Инновационные технологии и продукты». Новосибирск, 2000. – Вып. 4. – С. 9–13
11. 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.
12. Семенова, Е.Ф. Фармбиотехнологическая характеристика *Eremothecium* – продуцента рибофлавина и эфирного масла / Е.Ф. Семенова, А.И. Шпичка // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. – Вып. 67. – С. 368–372.