

УДК 579.66

Состав и продукция эфирного масла при глубинном культивировании штаммов *Eremothecium ashbyi* и *E. gossypii*

© 2020 Е. Ф. СЕМЕНОВА^{1,*}, В. С. ПРЕСНЯКОВА², А. В. КУРАКОВ³, Е. И. БЕЗРУКОВА¹¹Пензенский государственный университет, Пенза, 440026²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, 119991³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234

*e-mail: sef1957@mail.ru

Поступила в редакцию 15.09.2019 г.

После доработки 26.11.2019 г.

Принята к публикации 06.03.2020 г.

Исследовали зависимость накопления эфирного масла у штаммов *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 и *Eremothecium gossypii* Kurtzman 1995 от различных эндогенных факторов. Выявлена тенденция взаимосвязи уровня продукции эремотецевого масла с величиной pH культуральной среды в конце ферментации. При этом от конкретного штамма зависела сумма монотерпеновых спиртов и соотношение гераниола с другими спиртами. Показано, что штамм *E. ashbyi* ВКПМ F-1320 является наиболее перспективным по уровню продукции и компонентному составу масла.

Ключевые слова: *Eremothecium*, накопление фенилэтилового и монотерпеновых спиртов, эфирное масло.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-12-15

Одним из эфирномасличных растений, масло которого высоко ценят во всем мире на протяжении тысячелетий, является роза (*Rosa* L.). Существующие производства розового масла не способны удовлетворить растущий спрос на натуральные душистые вещества пищевой, парфюмерно-косметической, химико-фармацевтической промышленности. Использование культуры клеток розы дает на порядок меньшую продукцию масла, чем лепестки растения, и его состав отличается от традиционного розового масла [1].

В 80-90-е годы XX века была показана возможность получения ароматических веществ с помощью микроорганизмов, в частности микроскопических грибов [2, 3]. Было обнаружено, что *Eremothecium ashbyi* Guilliermond и *E. gossypii* (Ashby et Nowell) Kurtzman (синоним *Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Guilliermond) способны выделять в среду эфирное масло, близкое по составу розовому маслу [4, 5]. В связи с этим была поставлена задача по созданию биотехнологий, в которых *E. ashbyi* и *E. gossypii* используются в качестве продуцентов эфирного масла. Для этого необходимо было проведение комплексного исследования ароматических продуктов различного компонентного состава, в частности, выявления возможных критериев оптимизации разрабатываемой биотехнологии и факторов, влияющих на выход и качество эремотецевого масла.

Цель работы – изучение влияния некоторых эндогенных факторов на качественный и количественный состав эфирного масла при глубинном культивировании штаммов *Eremothecium ashbyi* и *E. gossypii*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-36, ВКПМ F-1320, ВКМ F-3009, ВКМ F-4565, ВКМ F-4566 и *Eremothecium gossypii* (Ashby S.F. et Nowell W. 1926) Kurtzman 1995 ВКМ F-3276, ВКМ F-3296. Микромицеты подерживали на скошенном картофельно-декстрозном агаре (г/л: картофель – 200,0; декстроза – 20,0; агар-агар – 30,0; pH 6,0). Посевной материал культивировали в жидкой глюкозо-пептонной среде (г/л: глюкоза – 7,5; пептон – 4,0; натрия сукцинат – 2,0; K₂HPO₄ – 0,5; инозит – 0,14; pH 6,5) при непрерывном встряхивании 200 об/мин в течение 20 ч при температуре 28 °С. Ферментацию проводили глубинным способом в соево-сахарозной среде (г/л: сахароза – 15,0; соевая мука – 30,0; pH 7,0) в течение 48 ч при температуре 28 °С и непрерывном встряхивании 240 об/мин.

Биомассу продуцента отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, взвешивали до и после высушивания в течение 2 ч при 105 °С.

Список сокращений: МТС – монотерпеновые спирты, ФЭС – β-фенилэтиловый спирт

Для выделения ароматообразующих веществ из культуральной жидкости применяли два метода: гидродистилляцию и трехкратную экстракцию гексаном с последующим удалением растворителя при помощи роторного испарителя под вакуумом. Для количественного определения эфирного масла, полученного гидродистилляцией, использовали методику, изложенную в Государственной фармакопее. Количество эрмотецевого масла, выделенного экстракцией, рассчитывали взвешиванием на аналитических весах остатка после удаления растворителя [6].

Определение компонентного состава извлеченного масла проводили на хроматографе Perkin-ElmerClarus 680 с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой с полярной неподвижной фазой [7]. При расчетах процентного содержания компонентов в масле использовали метод нормализации.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Microsoft Office Excel 2007 и пакета Statistica [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивное накопление посевного материала происходило у *E. ashbyi* ВКПМ F-4566, а биомассы в процессе ферментации – у *E. ashbyi* ВКПМ F-1320 и ВКМ F-3009 (табл. 1, 2).

При получении инокулята сдвиг pH в кислую сторону был больше у штамма *E. ashbyi* ВКМ F-4566, а при ферментации защелачивание было более выражено у штамма *E. ashbyi* ВКМ F-4565.

По уровню эфирного масла (дистилляционного эрмотецевого масла) в культуральной среде выделились штаммы *E. ashbyi* ВКПМ F-1320, ВКМ F-3009 и ВКМ F-4565. Наименьшее его количество синтезировали штаммы *E. gossypii* ВКМ F-3276 и ВКМ F-3296 (табл. 2). При этом максимальными значениями экстракционного эрмотецевого масла характеризовались штаммы ВКМ F-4565, ВКМ F-3296, ВКМ F-3009, что возможно свидетельствует о большей их биосинтетической активности в отношении других липофильных соединений. Для исследуемых штаммов

Таблица 1

Накопление биомассы при получении посевного мицелия штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii*

Biomass accumulation of *E. ashbyi* and *E. gossypii* strains

Штамм	Биомасса, г/л		pH
	сырая	сухая	
<i>E. ashbyi</i>			
ВКПМ F-1320	35,41±0,19	2,23±0,02	5,20±0,00
ВКПМ F-36	38,56±0,44	2,40±0,00	5,08±0,02
ВКМ F-4566	37,21±0,29	2,62±0,08	5,04±0,01
ВКМ F-4565	41,37±0,33	2,47±0,03	5,10±0,00
ВКМ F-3009	31,64±0,16	2,14±0,06	5,33±0,02
<i>E. gossypii</i>			
ВКМ F-3276	19,61±0,09	0,94±0,01	5,13±0,02
ВКМ F-3296	22,94±0,06	1,26±0,04	5,06±0,04

Таблица 2

Сравнительный анализ продуктивности штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* на ферментационной среде

Productivity of *E. ashbyi* and *E. gossypii* strains during fermentation

Штамм	Биомасса, г/л		pH	Эрмотецевоe масло, мг/л, полученное способом	
	сырая	сухая		гидродистилляции	экстракции
<i>E. ashbyi</i>					
ВКПМ F-1320	78,98±0,02	8,95±0,05	7,05±0,05	240,0±10,0	635,0±4,0
ВКПМ F-36	72,30±0,05	8,58±0,02	6,80±0,02	127,0±3,0	450,0±8,0
ВКМ F-4566	64,81±0,09	8,72±0,03	6,90±0,00	129,0±3,0	440,0±5,0
ВКМ F-4565	68,43±0,02	8,44±0,01	7,11±0,09	150,0±5,0	875,0±1,0
ВКМ F-3009	84,49±0,01	8,90±0,05	7,09±0,01	200,0±7,0	800,0±3,0
<i>E. gossypii</i>					
ВКМ F-3276	129,0±0,05	10,64±0,01	5,87±0,03	45,0±1,0	670,0±3,0
ВКМ F-3296	64,82±0,03	17,42±0,03	5,41±0,09	72,0±2,0	820,0±8,0

наблюдали тенденцию прямой (положительной) связи уровня накопления эремотецевого масла с кислотностью среды (рН в конце ферментации), которая носит опосредованный характер.

Для эфирномасличного сырья принципиальное значение имеет состав и содержание отдельных компонентов в масле. Основными ароматообразующими соединениями, синтезируемыми видами *E. ashbyi* и *E. gossypii*, являются ароматический спирт β-фенилэтанол (ФЭС) и монотерпеновые спирты (МТС) – гераниол, цитронеллол, нерол [9-11]. Образцы масел, полученных с использованием штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii*, значительно отличались по содержанию тех или иных компонентов (табл. 3). Эремотецевое масло штаммов *E. ashbyi* характеризуется более высоким уровнем накопления ценных монотерпеновых спиртов, чем *E. gossypii*. Наибольшее суммарное количество монотерпеновых спиртов имели масла *E. ashbyi* ВКПМ F-1320, ВКМ F-4566 и ВКМ F-3009. В эремотецевом масле исследованных штаммов *E. gossypii* в среднем в 9,3 раза выше массовая доля ФЭС, чем в эремотецевом масле исследованных штаммов *E. ashbyi* (рис. 1). Это, видимо, связано с тем, что представители *E. gossypii* более активны в метаболическом превращении фенилаланина и глюкозы с образованием фенилпирувата – предшественника ФЭС [12].

Известно, что геранилпирофосфат является предшественником остальных терпенов в растительных клетках [13]. В результате анализа была выявлена тенденция между увеличением содержания гераниола и снижением содержания другого монотерпенового спирта – цитронеллола в масле, что косвенно подтверждает возможное сходство путей биосинтеза монотерпеновых спиртов в мицелии эремотеция и секреторных структурах эфирномасличных растений.

На основании данных газохроматографического анализа были рассчитаны отношения между основными компонентами эремотецевого масла в составе его образцов (табл. 3). Минимальное отношение фенилэтилового спирта к монотерпеновым спиртам было в эфирных маслах штаммов ВКПМ F-4566 и ВКПМ F-1320, что свидетельствует о их большей парфюмерной ценности.

Таким образом, качественный и количественный состав эремотецевого масла является видо- и штаммоспецифичным, то есть от конкретного штамма *E. ashbyi* и *E. gossypii* зависит сумма монотерпеновых спиртов и соотношение гераниола с другими спиртами. Наиболее приближено к международному стандарту «Розовое эфирное масло» [14] является масло, получаемое из культуральной жидкости *E. ashbyi* штамма ВКПМ F-1320.

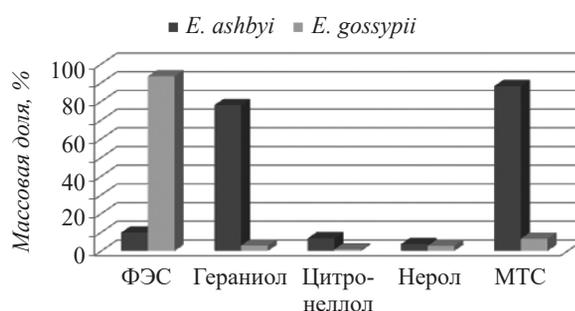


Рис. 1. Массовая доля ФЭС и МТС при культивировании *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 (приведены средние значения для исследованных штаммов).

Fig. 1. Mass fraction of 2-phenylethanol and monoterpene alcohols in Eremothecium oil produced by *E. ashbyi* Guilliermond 1935 and *E. gossypii* Kurtzman 1995.

Таблица 3

Сравнительная характеристика компонентного состава эремотецевого масла, синтезируемого штаммами *E. ashbyi* и *E. gossypii*

Component composition of Eremothecium oil synthesized by *E. ashbyi* and *E. gossypii* strains

Штамм	ФЭС, %	Гераниол, %	Цитронеллол, %	Нерол, %	МТС, %	ФЭС/МТС	Гераниол/цитронеллол	Гераниол/нерол
<i>E. ashbyi</i>								
ВКПМ F-36*	18,00	74,10	5,60	2,00	81,70	0,220	13,23	37,05
ВКПМ F-1320	4,30	80,90	11,40	3,40	95,70	0,045	7,10	23,79
ВКМ F-4566*	8,60	82,80	4,00	2,50	89,30	0,096	20,70	33,12
ВКМ F-4565*	8,90	73,70	7,40	4,90	86,00	0,103	9,96	15,04
ВКМ F-3009*	9,30	78,60	5,40	5,40	89,40	0,104	14,56	14,56
<i>E. gossypii</i>								
ВКМ F-3276	97,91	0,78	0,66	0,65	2,09	46,847	1,18	1,20
ВКМ F-3296	88,98	5,05	1,04	4,93	11,02	8,074	4,86	1,02

Примечание: * – компонентный состав эремотецевого масла данных штаммов включает также монотерпеновые ациклические альдегиды: цитраль, гераниаль, нераль.

Note: * – essential oil produced by these strains also contains monoterpene acyclic aldehydes, such as citral, geranial, neral.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шпичка А.И., Семенова Е.Ф. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии на основе эремотеция – продуцента рибофлавина и эфирного масла. *Успехи современного естествознания*, 2013, 11, 87–98.
2. Bomgardner M. M. The sweet smell of microbes. *Chemical & Engineering News*, 2012, 90(29), 25–29. doi: 10.1021/cen-09029-bus1
3. Christen P. Producción de aromas por fermentación en medio sólido. *Tópicos de investigación posgrado*, 1995, IV(2), 102–109.
4. Семенова Е.Ф., Бугорский П.С. Некоторые итоги поиска биотехнологически перспективных ароматообразующих культур. *Труды ВНИИ эфиромасличных культур*, 1989, 20, 14–16.
5. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф. Душистые вещества мицелиального гриба *Ashbya gossypii*. *Химия природных соединений*, 1991, (3), 428.
6. Государственная фармакопея РФ. XIII издание. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2015, 2, 264–453.
7. Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение. М.: Школа Косметических Химиков, 2005, 51–81.
8. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Издательство РАМН, 2000, 7–42.
9. Carrau F.M., Medina K., Boido E., Farina L. et al. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243, 107–115. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.050
10. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. *Известия вузов. Поволжский регион. Серия «Медицинские науки»*, 2007, (4), 44–50.
11. Семенова Е. Ф., Шпичка А. И., Моисеева И. Я. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности видов рода *Eremothecium* S. F. Ashby et W. Nowell. *Фундаментальные исследования. Биологические науки*, 2011, (6), 210–214. url: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=21365> (дата обращения: 06.03.2020).
12. Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Преснякова Е.В. Накопление ароматического и монотерпеновых спиртов штаммами *Eremothecium ashbyi* с различным уровнем рибофлавиногенеза. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2017, 53(3), 333–340. doi: 10.7868/S055510991703014X.
13. Bouvier F., Suire C., d’Harlingue A., Backhaus R.A., Camara B. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal*, 2000, 24(2), 241–252.
14. ISO 9842:2003 Rose oil. 15 p. <https://www.iso.org/ru/standard/28611.html>

Composition and Production of Essential Oil during *Eremothecium ashbyi* and *Eremothecium gossypii* Submerged CultivationE. F. SEMENOVA^{1,*}, V. S. PRESNIAKOVA², A. V. KURAKOV³, and E. I. BEZRUKOVA¹¹Penza State University, Penza, 440026 Russia²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia³Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: sef1957@mail.ru

Received September 15, 2019

Revised November 26, 2019

Accepted March 06, 2020

Abstract—The dependence of essential oil accumulation by *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 and *Eremothecium gossypii* Kurtzman 1995 strains on various endogenous factors has been studied. It was found that the level of the *Eremothecium* oil synthesis correlated with the culture final pH at the end of fermentation. The quantity of monoterpene alcohols and the ratio of geraniol to other alcohols depended on the strain. It was shown that *E. ashbyi* ВКПМ F-1320 strain is the most promising in terms of essential oil production level and its composition.

Key words: *Eremothecium*, accumulation of phenylethanol and monoterpene alcohols, essential oil

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-12-15