

УДК 582.28:579.222.3.083.1

БИОСИНТЕЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ МИКРОМИЦЕТАМИ (ОБЗОР)

© 2011 г. Э. Г. Дедюхина*, Т. И. Чистякова*, М. Б. Вайнштейн*, **

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина, Пущино, Московская область, 142290
e-mail: dedeg@rambler.ru

**Пущинский государственный университет, Пущино, Московская область, 142290

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

Арахидоновая кислота (АК, 5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота) широко используется в медицине, фармацевтике, косметике, диетпитании, сельском хозяйстве и других областях. Расширение сфер применения АК и ее низкое содержание в природных источниках (печень свиней, надпочечная железа, яичный желток) диктуют необходимость развития микробиологического производства АК. В обзоре рассматриваются механизмы биосинтеза АК и пути регуляции активности ферментов, вовлеченных в этот процесс. Обобщены данные литературы об этапах микробиологического производства АК, методах селекции активных штаммов-продуцентов, путях физиологической регуляции синтеза АК у микромицетов (влияние фазы роста, состава среды, pH, температуры, аэрации), эффективных технологиях ферментации и выделения конечного продукта. Представлены сведения о полном биотехнологическом процессе получения АК – от подбора штамма до увеличения выхода и очистки продукта.

Арахидоновая кислота (АК, 5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота) относится к омега-6 группе незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и играет важную роль в метаболических процессах в качестве предшественника простагландинов (серии 2), лейкотриенов и ряда эйкозаноидов. АК является действующим началом лекарственных средств и компонентов диетпитания, предотвращающих атеросклероз, коронарные болезни сердца и ряд других заболеваний. Подробная информация относительно применения АК в медицине и диетпитании приведена в обзорах [1–3].

В последние годы одной из наиболее важных областей применения АК являются питательные смеси для грудных детей [1, 2, 4]. Согласно рекомендациям Всемирной организация здравоохранения (ВОЗ), рекомендуемая норма потребления АК для недоношенных и нормальных грудных детей составляет 60 и 40 мг/кг в день соответственно. Рынок детского питания в мире достигает 10 миллиардов долларов в год [2].

Перспективным является использование АК в качестве стимулятора устойчивости растений к фитопатогенам [5–10]. Принимая во внимание, что препараты арахидоновой кислоты экологически безопасны, их применение позволит снизить или даже заменить использование экологически вредных фунгицидов, которые загрязняют экосистемы, нарушают равновесие и опасны для здоровья людей. Известно также, что АК повышает чувствительность патогенных дрожжей *Candida albicans* и *C. dubliniensis* к фунгицидам [11].

Основными природными источниками АК являются печень и надпочечная железа животных, а также желток куриных яиц; однако содержание АК на-

столько мало, что они не могут удовлетворить растущую потребность в этой физиологически активной кислоте. Кроме того, желток куриных яиц содержит холестерин и фосфор, поэтому его использование в больших количествах в качестве добавки к детскому питанию считается нежелательным [12].

Таким образом, ограниченность природных источников АК диктует необходимость развития ее микробиологического производства.

В настоящее время процессы получения АК с использованием различных штаммов грибов рода *Mortierella* запатентованы в Европе, Китае, Японии и США [13–18]. Промышленное производство микробных липидов с высоким содержанием АК (40–70%) существует в Италии и Китае [1]. АК включена в состав смесей для грудных детей в 60 странах мира и широко применяется в качестве пищевой добавки [1].

Механизмы сверхсинтеза липидов и образования арахидоновой кислоты. Известно, что необходимы условия интенсивного накопления липидов в клетках так называемых “липидных” микроорганизмов (образующих более 20% липидов от сухой биомассы) является разобщение конструктивного и энергетического метаболизма в условиях, когда рост клеток лимитирован питательными компонентами или ингибирован неблагоприятными значениями pH и температуры при избытке источника углерода и энергии в среде [19, 20].

Биохимические механизмы интенсивного синтеза липидов у микроорганизмов были детально исследованы группой Рэтлиджа [1, 21–24]. Предполагаются две основные причины сверхсинтеза липидов – интенсивный синтез ацетил-КоА в цитозоле и образование достаточного количества НАДФН [1,

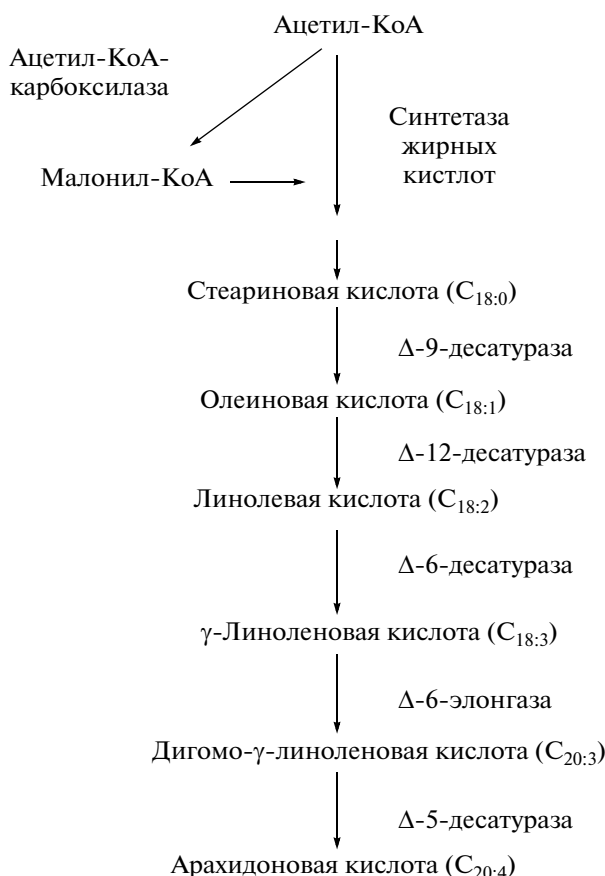


Схема биосинтеза арахидоновой кислоты [1, 3, 28].

22]. В настоящее время установлено, что активность малик-фермента, обеспечивающего запас НАДФН в клетке, лимитирует биосинтез жирных кислот у грибов [25, 26].

Биосинтез жирных кислот почти у всех организмов заканчивается образованием C_{16} - или C_{18} -насыщенных кислот, которые затем подвергаются серии реакций десатурации и удлинения с образованием полиненасыщенных жирных кислот. Известно, что десатуразы, являющиеся железосодержащими ферментами, вводят двойную связь в определенное положение от карбонильного конца жирной кислоты; эта реакция нуждается в молекулярном кислороде, НАД(Ф)Н, электрон-транспортной системе и концевой десатуразе [27]. Последовательность реакций удлинения жирных кислот такая же, как при синтезе жирных кислот *de novo*: основное различие заключается в том, что элонгаза является мембраносвязанным ферментом в отличие от синтетазы, которая является цитозольным ферментом [2].

Механизм биосинтеза АК представлен на рисунке [1, 3, 28]. Стеариновая кислота (C_{18}) превращается в олеиновую кислоту ($C_{18:1}$) с участием Δ -9-десатуразы. Установлено, что фермент, выделенный из *Mortierella alpina* 1S-4, является мембраносвязанным

белком ацил-КоА-типа, его аминокислотная последовательность имеет 45% сходство с аналогичным ферментом из *Saccharomyces cerevisiae* [28].

Превращение олеиновой кислоты в линолеовую ($C_{18:2}$) происходит при участии мембраносвязанной Δ -12-десатуразы.

При участии Δ -6-десатуразы линолевая кислота превращается в γ -линоленовую кислоту ($C_{18:3}$ ω -6). Имеются данные, что в результате экспрессии гена Δ -6-десатуразы (Δ -6-1) из *M. alpina* 1S-4 в *Aspergillus oryzae* достигнуто усиление синтеза γ -линоленовой кислоты трансформантом [28].

Гамма-линоленовая кислота затем удлиняется до дигомо- γ -линоленовой кислоты (ДГЛК) ($C_{20:3}$ ω -6) при участии Δ -6-элонгазы. Предполагается, что именно активность Δ -6-элонгазы лимитирует скорость синтеза АК у *M. alpina* [29–31].

Как видно из рисунка, ДГЛК превращается в арахидоновую кислоту ($C_{20:4}$ ω -6) при участии Δ -5-десатуразы. Обнаружено, что мутант *M. alpina* 1S-4, характеризующийся отсутствием Δ -5-десатуразы, синтезировал ДГЛК и не образовывал АК [32, 33].

Для регуляции активности ферментов синтеза АК у грибов предлагается использовать как физиологические, так и генетические методы. В частности, известен прием повышения доли АК и других ПНЖК в липидах *Pythium debarianum* путем ингибирования активности липоксигеназы в присутствии витамина K_1 [34]. Показано, что активация Δ -12-десатуразы у дрожжей может быть достигнута при воздействии ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) [27]. Было установлено, что экспрессия гена Δ -9-десатуразы у грибов подавлялась при добавлении ненасыщенных кислот в питательную среду и стимулировалась низкотемпературным стрессом [2, 27]. В последние годы приемы генной инженерии широко используются для регуляции синтеза АК. В частности, имеются данные, что экспрессия гена, кодирующего Δ -12-десатуразу, в мутантный штамм *M. alpina* JT-180 привела к усилению синтеза АК в 1.7 раза [28]. В результате экспрессии в *M. alpina* гена, кодирующего Δ -6-элонгазу, синтез АК у трансформанта усилился в 1.9 раза по сравнению с диким штаммом [28, 31].

Имеется информация, что экспрессия генов Δ -5-, Δ -6-, Δ -9- и Δ -12-десатураз из *M. alpina* в *A. oryzae*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Yarrowia lipolytica* превращала данные виды в потенциальные продуценты незаменимых жирных кислот [3, 35–38]. Генетически стабильные трансформанты являются также идеальными моделями для изучения механизмов липогенеза у грибов.

Продуценты арахидоновой кислоты. Изомеры ПНЖК относятся главным образом к ω -3- и ω -6-типам (цифра означает положение двойной связи от метильного конца молекулы жирной кислоты). Способность организмов к синтезу тех или иных

изомеров ПНЖК рассматривается в качестве таксономического признака [39]. Известно, что представители классов Basidiomycetes и Ascomycetes образуют ненасыщенные кислоты только ω -3-типа, тогда как представители Phycomycetes (подклассы Oomycetes и Zygomycetes) синтезируют преимущественно ω -6-ПНЖК.

В настоящее время мицелиальные грибы считаются наиболее перспективными продуцентами АК, хотя в ряде исследований в качестве потенциальных источников АК рассматриваются водоросли [40–42].

Исследованию синтеза АК представителями подкласса Oomycetes посвящена серия работ И.В. Коновой с соавт. [34, 43–48]. Синтез эйкозаполиеновых кислот ($C_{20:3}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$), до 30% от суммы кислот был обнаружен у различных видов оомицетов из рода *Saprolegnia*. Наибольшее содержание АК (18.6–24.6% от липидов) отмечено у штаммов *S. blehamensis* на среде с глюкозой и бактопептоном [45]. У оомицетов рода *Phytophthora* в составе липидов преобладала эйкозапентаеновая кислота и доля АК не превышала 10% от суммы жирных кислот [44]. Следовые количества АК обнаружены у оомицетов *Absidia corymbifera* [48].

Имеются сведения о синтезе АК грибами *P. ultimum* (16.1% от липидов; 322 мг/л) [49], *P. debaryanum* (11.4–14.7% от суммы жирных кислот) [46, 47] и *P. insidiosum* (30–35% от липидов) [4].

Анализ данных литературы показывает, что наиболее перспективные продуценты АК были обнаружены среди видов *Mortierella* (класс Phycomycetes, подкласс Zygomycetes, семейство Mortierellaceae). Согласно классификации [50], виды *Mortierella* подразделяются на 7 секций (*Isabellina*, *Stylospora*, *Alpina*, *Jenkinia*, *Dichotoma*, *Hygrophila* и *Polycephala*), главным образом, по морфологическим признакам. Позднее данная классификация была модифицирована [51]: род *Mortierella* был разделен на 2 подрода (*Micromucor* и *Mortierella*). Было показано, что эти подроды различались по жирнокислотному составу липидов: подрод *Mortierella* содержал виды, синтезирующие АК, тогда как представители подрода *Micromucor* не обладали этой способностью [52–54].

Содержание АК у одного и того же вида, как правило, варьирует в широких пределах, что может объясняться как штаммовыми различиями, так и влиянием условий культивирования.

У представителей секции *Stylospora* (*M. humilis*, *M. camargensi*, *M. lignicola*, *M. sepedonioides*, *M. stylospora*, *M. zonata*) доля АК в липидах составляет от 6.2 до 27.5%. Наиболее активные штаммы относятся к виду *M. humilis* (*M. verticillata*) [53–55].

Представители секции *Jenkinia* (*M. dichotoma*, *M. jenkinsii*, *M. sclerotiella*) характеризуются сравнительно низким содержанием АК в липидах (5.9–11.8%) [56].

У фикомицетов секции *Hygrophila* (*M. elongata*, *M. bainieri*, *M. beljakovae*, *M. clonocystis*, *M. epigama*, *M. gemmifera*, *M. hyalina*, *M. hygrophila*, *M. kuhlmannii*, *M. marburgensis*, *M. minutissima*, *M. nigrescens*, *M. sarnyensis*, *M. sclerotiella*, *M. selenospora*, *M. zychae*) доля АК в липидах варьирует от 6.2 до 35.6%; наиболее активными продуцентами являются штаммы *M. elongata* [53–55, 57].

Синтез АК у представителей секции *Polycephala* (*M. polycephala*, *M. gamsii*, *M. nantahalensis*, *M. oligospora*, *M. parvispora*, *M. pulcheria*, *M. reticulata*, *M. spinosa* (*M. exigua*), *M. umbellata*) варьирует в пределах 6.2–41.8% от липидов; наиболее активные штаммы относятся к виду *M. polycephala* [53–55].

Секция *Alpina* включает виды, синтезирующие АК от 12.7 до 75% от липидов (*M. alpina*, *M. alliacea*, *M. clausenii*, *M. globalpina*, *M. globulifera*, *M. pusilla*, *M. strangulata*, *M. rostafinskii*). Следует отметить, что наиболее перспективными продуцентами являются штаммы вида *M. alpina*, липиды которых содержат более 40% АК [58–66]. Показано, что представители данного вида непатогенны, не образуют микотоксинов и потенциально аллергенных спор в условиях глубинной ферментации [67]. Липиды *M. alpina* не проявляют острой токсичности и не обладают мутагенной или кластогенной активностью [68], что особенно важно при использовании АК-содержащих липидов в качестве пищевых добавок.

Считается, что физиологически активные ПНЖК сосредоточены в основном в фосфолипидной фракции [69, 70]. Однако в исследованиях с грибами, относящимися к подклассу Oomycetes (*P. debaryanum* и *P. cryptogea*) было установлено, что АК, в отличие от эйкозапентаеновой кислоты ($C_{20:5}$), локализована преимущественно во фракции триацилглицеринов (ТАГ) [44, 71]. Подобная закономерность обнаружена и у грибов рода *Mortierella*; в частности, было показано, что у *M. hygrophila* основная часть внутриклеточного пула АК (83.7%) сконцентрирована в ТАГ и только 16.3% содержится в фосфолипидах [57]. Позднее было установлено, что основная масса АК в мицелии *M. alpina* также сконцентрирована в ТАГ [72, 73]. Было обнаружено, что АК в составе ТАГ у грибов *Mortierella* локализована преимущественно в положении 1 и, следовательно, легко высвобождается при воздействии панкреатической липазы [74]. Высокое содержание АК (до 50% от суммы жирных кислот), обнаруженное в спорах *M. alpina*, свидетельствует, по мнению авторов, о ее роли в качестве резерва углерода и энергии, который расходуется при прорастании спор [75].

Селекция продуцентов арахидоновой кислоты. Для селекции продуцентов АК разработан ряд приемов. Один из методов основан на использовании ацетилсалициловой кислоты (АСК). Известно, что АСК является ингибитором метаболизма АК, ацетилирует концевую аминогруппу одной из субъединиц простагландин-синтетазы и тормозит биосинтез про-

стагландинов [76]. В частности, было показано, что АСК в концентрации 1 мМ ингибирует синтез АК-метаболитов у дрожжей [77, 78]. При исследовании влияния различных концентраций АСК на рост 87 штаммов грибов рода *Mortierella* было обнаружено, что АСК в концентрации 0.84 г/л селективно ингибировала рост АК-образующих штаммов и не оказывала влияния на рост грибов, не способных к синтезу АК. Данный метод был использован для селекции грибов рода *Mortierella*, продуцентов АК [79].

Известен быстрый метод селекции продуцентов АК, основанный на корреляции между содержанием АК в липидах и интенсивностью окраски мицелия хлористым трифенилтетразолием [63].

В качестве одного из критериев при отборе мутантов грибов, продуцентов АК или эйкозапентаеновой кислоты, предложено использовать такой морфологический признак, как степень развития воздушного мицелия колоний, образованных на агаризованной среде [80].

Мутант *M. alpina* SAM2239, образующий до 75% АК от суммы жирных кислот, был получен при обработке исходного штамма *M. alpina* IFO8568 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином [13].

В последние годы приемы генной инженерии (экспрессия генов, ответственных за те или иные промежуточные реакции синтеза АК) успешно используются для повышения синтеза АК у штаммов грибов рода *Mortierella* [28, 81, 82]. Мутанты, полученные в результате химического мутагенеза, подвергают прямой трансформации маркерами устойчивости к антибиотикам или маркерами урацил-ауксотрофии [28]. Показано, что мутант *M. alpina* JT-180, дефектный по Δ -12-десатуразе, проявлял повышенные активности Δ -5- и Δ -6-десатураз, поэтому экспрессия гена Δ -12-десатуразы в данный штамм привела к значительному усилению синтеза АК [28]. Примеры получения генетически стабильных трансформантов, характеризующихся повышенным синтезом тех или иных ПНЖК, приведены в работе [28].

Следует отметить, что селекция новых штаммов-продуцентов АК остается актуальной задачей. Необходимым условием развития промышленного производства АК является также разработка приемов физиологической регуляции синтеза АК, оптимизация ферментационного процесса.

Влияние условий культивирования на синтез арахиновой кислоты у грибов. Зависимость жирнокислотного состава микробных липидов от условий культивирования продуцентов (фаза роста, состав среды, pH и температура) обсуждается в ряде обзоров [2, 3, 83–85].

Представленная в данном разделе информация касается преимущественно регуляции синтеза АК у представителей рода *Mortierella*, поскольку они считаются наиболее перспективными продуцентами.

Считается, что интенсивный синтез липидов у микроорганизмов является типичным двухфазным процессом и происходит в стационарную фазу роста периодических культур [21]. Исключения из этого правила очень редки, известны лишь несколько штаммов дрожжей [86, 87] и штамм грибов *M. alpina* LPM-301 [60], характеризующихся уникальной способностью к интенсивному синтезу липидов в период активного роста. У штамма *M. alpina* LPM-301 синтез липидов совпадал по времени с активным ростом мицелия и достигал наибольшего значения в стационарную фазу роста. В условиях непрерывного культивирования штамма увеличение удельной скорости роста от 0.03 до 0.05 ч⁻¹ приводило к двукратному увеличению удельной скорости синтеза липидов [60]. Интересно отметить, что при периодическом культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 содержание липидов в стационарной фазе оставалось неизменным, тогда как доля АК в липидах продолжала увеличиваться до конца ферментации (210 ч) за счет метаболизации как насыщенных жирных кислот, так и ненасыщенных АК-предшественников [60]. Превращение внутриклеточных жирных кислот в АК было также обнаружено у штамма *M. alpina* M6 после истощения глюкозы в среде [58].

Имеются данные, что инкубация отфильтрованного мицелия *M. alpina* при 28°C в течение 6 сут приводила к снижению содержания пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот и увеличению доли АК до 67.4% от суммы жирных кислот [52]. Превращение олеиновой и линолевой кислот в АК в стационарную фазу роста было также обнаружено у штамма *M. alpina* SC9 [66].

Таким образом, для повышения доли АК в мицелиальных липидах можно рекомендовать продление стационарной фазы роста или инкубирование отфильтрованного мицелия в течение нескольких суток. Однако следует иметь в виду, что данные приемы не приводят к увеличению количества липидов в мицелии.

Необходимым условием интенсивного синтеза липидов у микроорганизмов является избыток в среде источника углерода и энергии и лимитирование роста недостатком минеральных компонентов (азот, фосфор, ионы металлов). Установлено, что в условиях лимитирования роста грибов недостатком азота концентрация избыточного углеродного субстрата оказывает существенное влияние как на образование липидов, так и на синтез АК. При концентрации глюкозы в среде выше 150 г/л снижался выход липидов и АК у *M. alpina* [12]. Отношение С/Н в среде, оптимальное для синтеза АК различными штаммами рода *Mortierella*, варьирует от 5 до 60 [14, 15, 64, 88].

Наиболее часто используемым углеродным субстратом для синтеза АК фикомицетами является глюкоза [12, 60, 89].

Имеются данные, что этанол стимулировал образование АК грибами [90–92]. Показано, что дробная добавка этанола к растущей культуре *M. alpina* ME-1 повышала образование АК в 1.7 раз (до 19.8 г/л) [91].

Недавно в качестве субстрата для синтеза АК грибами рода *Mortierella* был успешно использован глицерин [55]. Поскольку глицерин образуется в больших количествах в качестве побочного продукта при производстве биодизеля из растительных масел, его использование для производства АК следует считать перспективным.

Данные о влиянии растительных масел на синтез АК грибами *Mortierella* довольно противоречивы [52, 59, 93]. Анализ активности ферментов *M. alpina* при культивировании гриба на средах, содержащих жирные кислоты, показал, что экзогенные липиды подавляли *de novo* синтез жирных кислот, но не влияли на десатурацию или удлинение уже существующих жирных кислот [29]. Известно, что кунжутное масло оказывало значительное влияние на жирнокислотный состав липидов *M. alpina* 1S-4, увеличивая отношение ДГЛК к АК [94]. Позднее было обнаружено, что кунжутное масло содержит сезамин, который ингибирует Δ -5-десатуразу, ответственную за превращение ДГЛК в АК [95].

Имеются данные, что внесение стерина (эргостерин и холестерин) в питательную среду стимулировало рост оомицета *P. debaryanum* в 3.7–4.3 раза, что приводило к значительному повышению выхода АК (в расчете на объем среды) [46].

Для культивирования фикомицетов используют преимущественно комплексные азотсодержащие субстраты, такие, как соевая мука, мясной, кукурузный, дрожжевой экстракты [16, 65, 66, 94, 96]. Однако некоторые штаммы *Mortierella* могут успешно расти и синтезировать АК при ассимиляции индивидуальных источников азота – соли аммония, нитраты и мочевины [60, 64, 97]. В частности, при культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 на средах с глюкозой и нитратом калия или мочевиной в качестве единственных источников азота образование АК достигало 4.5 и 4.2 г/л соответственно [60]. Имеются данные, что глутамат стимулировал синтез АК у *M. alpina*, однако механизм его действия не ясен [62, 98].

Влияние ионов металлов на синтез АК у грибов изучено очень слабо. Роль незаменимых ионов металлов (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Ni) в метаболизме микроорганизмов связывают, главным образом, с их участием в структуре и функционировании металлоферментов и в стабилизации клеточных мембран [27, 99–101].

Имеются данные о возможности замены ионов металлов в составе ферментов; образующиеся производные часто сохраняют активность, но отличаются от природных ферментов спектром ферментативной активности [85]. Эти наблюдения позволяют предположить, что метод замены ионов металлов

может быть использован для регуляции метаболизма микроорганизмов. В частности, замена ионов Zn^{2+} на Co^{2+} в хемотропной культуре липидообразующих дрожжей *Trichosporon pullulans* привела к усилению синтеза липидов [85]. Можно предположить, что подобный подход может быть использован для регуляции синтеза липидов и АК у грибов.

Было высказано предположение, что ионы цинка регулируют активность глицерол-3-фосфат дегидрогеназы в дрожжевых клетках и оказывают существенное влияние на синтез липидов [102]. Имеются сведения, что ионы цинка повышают активность Δ -12-десатуразы, которая участвует в синтезе линолевой кислоты из олеиновой [27].

Поскольку десатуразы являются железосодержащими ферментами [27], можно предположить, что концентрация ионов железа в среде должна оказывать влияние на синтез полиненасыщенных жирных кислот у грибов. Влияние ионов железа на метаболизм липидов, вероятно, также связано с их участием в регуляции синтеза цитрата, роль которого в образовании жирных кислот детально исследована [1, 21, 23, 24]. Обратная зависимость между концентрацией ионов железа в среде и содержанием липидов обнаружена у дрожжей [103]. Подобные результаты были также получены в исследованиях с грибами: добавление ионов Fe^{2+} (800 мг/л) в среду Чапека подавляло синтез липидов у штамма *Mortierella* sp. S-17 [104].

Группой японских авторов показано, что увеличение концентрации солей Na_2SO_4 , $CaCl_2$ и $MgCl_2$ на фоне комплексной среды с соевой мукой и дрожжевым экстрактом повышало выход АК у штамма *M. alpina* 1S-4 [105]. При одновременном лимитировании роста грибов ионами Fe^{3+} и Mg^{2+} наблюдалось нарушение обмена липидов у грибов *Zygomycetes* [106]. В исследованиях со штаммом *M. schmuckeri* S-12 было обнаружено, что снижение концентрации ионов магния в среде усиливало синтез АК [15].

Противоречивые результаты получены по влиянию ионов марганца на синтез липидов и АК у грибов: внесение ионов Mn^{2+} (2 мг/л) в среду Чапека стимулировало синтез липидов и АК у *Mortierella* sp. S-17 [104], в то же время ионы марганца не оказывали влияния на синтез липидов у грибов рода *Microascus* [107]. Очевидно, действие ионов марганца на синтез липидов и АК у грибов зависит от особенностей штаммов.

В заключение следует отметить, что концентрация ионов металлов в среде является эффективным, но еще мало изученным фактором регуляции синтеза липидов и АК у грибов.

Из физических факторов наибольшее влияние на жирнокислотный состав липидов оказывает температура. Считается, что адаптивные реакции микроорганизмов на действие температуры включают изменение уровня ненасыщенных жирных кислот в

Микробиологическое получение арахидоновой кислоты

Штамм	Образование АК	Ссылка
<i>Mortierella alpina</i> LPM-301	60.4% от суммы липидов; 18.8% от биомассы	[60]
<i>M. alpina</i> M-6	54.5% от суммы липидов; 20.9% от биомассы	[58]
<i>M. alpina</i>	18.8 г/л	[97]
<i>M. alpina</i> ME-1	19.8 г/л	[91]
<i>M. alpina</i> CBS 168.95	50–60% от суммы липидов	[17, 18]
<i>M. alpina</i> 1S-4	18.2 г/л	[16]
<i>M. schmuckeri</i> S12	40.3% от суммы липидов; 13.6% от биомассы	[14, 15]
<i>M. alpina</i> SAM2239	75% от суммы липидов; 4.1 г/л	[13]
<i>M. alpina</i> ATCC 42430	40% от триацилглицеринов	[4]

липидов мембран [108]. Как правило, снижение температуры культивирования стимулирует синтез ненасыщенных жирных кислот у грибов [3, 13, 69, 72]. Прием культивирования грибов в условиях низкой температуры был использован для селекции штаммов—продуцентов АК, большая часть которых принадлежала к виду *M. alpina* [78].

Было показано, что активности Δ-6- и Δ-5-десатураз, участвующих в синтезе АК, возрастают при понижении температуры и, следовательно, для увеличения выхода АК желателен культивирование продуцентов при пониженной температуре [9, 73]. Однако следует иметь в виду, что при понижении температуры может усиливаться синтез жирных кислот, более ненасыщенных, чем АК. В частности, было установлено, что оптимальная температура для синтеза АК представителями рода *Mortierella* (*M. hygrophila*, *M. zychae*, *M. elongata*, *M. parvispora*, *M. schmuckeri* и *M. alpina*), составляла 25–28°C, тогда как при понижении температуры синтезировалась преимущественно более ненасыщенная эйкозапентаеновая кислота (C_{20:5}) [94, 109, 110]. Подобная закономерность обнаружена и у оомицетов рода *Saprolegnia* [45].

Таким образом, понижение температуры культивирования продуцентов является эффективным приемом усиления синтеза АК. Рекомендуется использовать штаммы, не способные к синтезу кислот с более высокой степенью ненасыщенности, чем АК.

Анализ литературы показывает, что, как правило, pH не оказывает существенного влияния на синтез липидов у эукариотных микроорганизмов [83], хотя имеются данные, что содержание полиненасыщенных жирных кислот в липидах *M. rammaniana* var. *angulispora* возрастало с увеличением величины pH [3, 111].

Можно предположить, что более существенное влияние на синтез полиненасыщенных кислот у грибов должна оказывать степень аэрации, поскольку реакции десатурации жирных кислот требуют присутствия молекулярного кислорода. Исследованию влияния концентрации растворенного кислорода на морфологию грибов и синтез полиненасыщенных жирных кислот посвящен ряд публикаций [65, 69, 112]. Полученные данные относительно влияния кислорода на синтез АК довольно противоречивы. Исследования, проведенные с грибами *Entomophthora exitalis*, показали, что концентрация кислорода не оказывала заметного влияния на синтез АК и других полиненасыщенных жирных кислот [69]. Однако имеются данные, что увеличение концентрации кислорода в газовой смеси, подаваемой в ферментер, до 25% (по сравнению с 21%) при культивировании *M. alpina* повышало образование АК (г/л) на 60% [112]. Следует отметить, что перспективность использования данного приема при промышленном производстве АК требует экономического обоснования. Наши исследования с липидообразующими дрожжами *T. pullulans* показали, что потребность клеток в кислороде резко возрастала при лимитировании роста недостатком ионов железа [103]. Это наблюдение еще раз подтверждает необходимость тщательного подбора состава питательной среды при культивировании продуцентов АК.

Способы микробиологического производства арахидоновой кислоты. Возрастающая потребность в АК, главным образом в медицине, фармацевтике и диетпитании, диктует необходимость разработки эффективных микробиологических процессов ее производства.

В таблице представлены современные наиболее эффективные примеры получения АК с использованием грибов рода *Mortierella*.

Как показали наши исследования, при периодическом культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 в течение 8 сут в ферментере объемом 100 л на среде с глюкозой и нитратом калия содержание АК достигало 60.4% от суммы липидов и 18.8% — от биомассы [60].

Во многих процессах промышленного получения АК используется метод культивирования продуцентов с дробным внесением углеродного субстрата, который позволяет избежать катаболической репрессии в присутствии высоких концентраций глюкозы. В частности, интенсивный синтез АК (54.5% от суммы липидов и 20.9% — от сухой биомассы) был достигнут при периодическом культивировании *M. alpina* M-6 с дробным внесением питательной среды, содержащей глюкозу и нитрат калия, на 3, 4 и 5 сут культивирования [58]. Процесс продолжался в течение 8 сут до полного потребления глюкозы. Концентрации добавляемых компонентов были рассчитаны на основании предварительного анали-

за динамики потребления субстратов данной культуры.

Образование АК в количестве 18.8 г/л грибом *M. alpina* было достигнуто методом периодического культивирования с подпиткой на среде с глюкозой и кукурузным экстрактом в течение 12.5 сут [97].

Двухстадийный процесс ферментации был применен для получения АК (19.8 г/л) с использованием штамма *M. alpina* ME-1 [91]. Для повышения выхода АК в ферментер вносили этанол (3 и 2%) на 5 и 7 сут культивирования соответственно.

Недавно предложен процесс получения АК (50–60% от липидов), включающий двухстадийное культивирование штамма *M. alpina* CBS 168.95 на среде, содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт и минеральные соли [17, 18]. В первой стадии грибы выращивали в условиях избытка глюкозы, концентрацию которой поддерживали на уровне 20 г/л в течение 6–8 сут; во второй стадии (3–5 ч) глюкоза полностью потреблялась и доля АК в липидах увеличивалась до 60% за счет метаболизации других внутриклеточных жирных кислот. Следует подчеркнуть, что во второй фазе содержание липидов в мицелии не возрастало.

Разработан метод получения полиненасыщенных жирных кислот с использованием приема криоконсервации клеток [16]. При культивировании штамма *M. alpina* 1S-4 на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и минеральные соли, в течение 306 ч содержание АК составляло 18.2 г/л. Стабильность ферментационного процесса достигалась использованием криоконсервированной культуры. Суспензию спор, глицерин и воду смешивали в соотношении 1 : 1 : 8 и криоконсервировали при –80°C.

Известен процесс получения АК (40.3% от суммы липидов; 13.6% от сухой биомассы), который включает культивирование штамма *M. schmuckeri* S-12 в течение 72 ч на среде, содержащей глюкозу, кукурузный экстракт, неорганические соли и витамины [14, 15]. Полученные липиды предложено использовать в качестве пищевых добавок или компонентов питательных смесей для детей.

Для получения липидов с высоким содержанием АК предложено использовать мутантный штамм *M. alpina* SAM2239, неспособный синтезировать эйкозапентаеновую ($C_{20:5}$) кислоту [13]. Грибы культивировали на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и неорганические соли, при 24°C в течение 3 сут, затем температуру снижали до 12°C для усиления синтеза АК, содержание которой составляло 75% от суммы липидов и достигало 4.1 г/л.

Способ получения липидов с высоким содержанием АК (до 40% от ТАГ) и низкой долей $C_{20:5}$ -кислоты (не более 1/5 от уровня АК) разработан с использованием штамма *M. alpina* ATCC 42430 [4]. Культивирование продуцента проводили на среде с глюкозой и соевой мукой. Полученные липиды предлагается добавлять в смеси для детского пита-

ния в количестве, сравнимом с содержанием АК в женском молоке.

Методы выделения и очистки арахидоновой кислоты из микробных липидов. Физико-химические методы выделения и очистки полиненасыщенных жирных кислоты детально описаны в обзоре [2].

Предварительное увеличение доли полиненасыщенных жирных кислот в микробных липидах может быть достигнуто следующими приемами. (1) Выдерживание липидов при пониженной температуре, при этом насыщенные кислоты выпадают в осадок и могут быть отделены от ненасыщенных жирных кислот. (2) Гидролиз глицеридов до глицерина и свободных жирных кислот путем омыления липидов щелочью или с использованием липаз. (3) Комплексообразование насыщенных кислот с мочевиной. С этой целью добавляют мочевины и водный раствор этанола к смеси жирных кислот, затем комплексы насыщенных кислот с мочевиной удаляют центрифугированием или фильтрованием; фильтрат подкисляют и ненасыщенные кислоты экстрагируют гексаном. (4) Использование 2- или 1,3-специфичных липаз для концентрирования ПНЖК. Поскольку известно, что АК в липидах грибов рода *Mortierella* локализована преимущественно в 1-положении триацилглицеринов [74], можно предположить, что использование ферментативного метода будет эффективным для концентрирования АК. Известно, что липазы успешно применялись для получения эфиров АК с сахарами, которые использовались в косметике, диетпитании и фармацевтике [2].

Следует отметить, что выделение высокоочищенной АК из смеси ПНЖК представляет серьезные трудности. Предлагается использовать ферментативные методы, ионообменную или высокоэффективную жидкостную хроматографию [2]. Следовательно, при микробиологическом производстве АК очень важно применять продуценты и условия культивирования, обеспечивающие получение липидов с преимущественным содержанием АК.

Можно утверждать, что в ближайшем будущем промышленные микробиологические процессы станут основным источником АК для медицины, фармакологии, косметики и сельского хозяйства.

Для развития эффективного микробиологического производства АК особое внимание должно быть уделено селекции активных штаммов-продуцентов и разработке ферментационной технологии, обеспечивающей получение липидов с преимущественным содержанием АК.

Анализ литературы позволяет постулировать несколько основных положений и дать рекомендации к развитию микробиологического производства АК. Так, можно сделать заключение, что, хотя способность к синтезу АК широко распространена среди мицелиальных грибов, относящихся к классу *Phyco-*

mycetes, наиболее перспективными продуцентами АК являются представители вида *M. alpina*. Показано, что штаммы данного вида непатогенны и не образуют микотоксинов. Для физиологической регуляции синтеза АК грибами могут быть использованы различные приемы. В частности, повышение уровня АК в липидах может быть достигнуто увеличением продолжительности стационарной фазы или инкубированием отфильтрованного мицелия в течение нескольких суток. Понижение температуры культивирования рекомендуется для интенсификации синтеза АК у штаммов, неспособных к образованию более ненасыщенных, чем АК кислот. Следует отметить, что концентрация ионов металлов в среде является эффективным, но еще мало используемым фактором регуляции синтеза АК у грибов. Анализ имеющихся процессов промышленного производства АК показывает, что наиболее перспективным является дробное внесение углеродного субстрата или использование приема двухстадийного культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ratledge C.* // *Biochimie*. 2004. V. 8. P. 807–815.
2. *Ward O., Singh A.* // *Process Biochem*. 2005. V. 4. P. 3627–3652.
3. *Dyal S.D., Narine S.S.* // *Food Res. Intern*. 2005. V. 38. № 4. P. 445–467.
4. *Kyle D.J.* // Patent JP (Japan). 2007. № 319161(A).
5. *Bostock R.M., Kuc J.A., Laine R.A.* // *Science*. 1981. V. 212. № 4490. P. 67–69.
6. *Preisig C.L., Kuc J.A.* // *Arch. Biochem. Biophys*. 1985. V. 236. № 1. P. 379–389.
7. *Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 3. С. 325–339.
8. *Озерецковская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И.* // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 4. С. 626–633.
9. *Ильинская Л.И., Чаленко Г.И., Переход Е.А., Озерецковская О.Л., Аверьянов А.А.* // Докл. РАН. 1998. Т. 359. № 6. С. 828–831.
10. *Eroshin V.K., Dedyukhina E.G.* // *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2002. V. 18. № 2. P. 165–167.
11. *Ells R., Kock J.L., VanWyk P.W., Botes P.J., Pohl C.H.* // *J. Antimicrob. Chemother*. 2009. V. 63. № 1. P. 124–128.
12. *Zhu M., Yu L.J., Wu Y.X.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2003. V. 30. № 1. P. 75–79.
13. *Akimoto K., Higashiyama K., Shimizu A.* // Patent JP (Japan). 2000. № 2000069987.
14. *Barclay W.R.* // Patent EP (Europe). 2006. № 1726217 (A1).
15. *Barclay W.R.* // Patent US (United States). 2007. № 2007002050.
16. *Higashiyama K.* // Patent JP (Japan). 2006. № WO2006016702 (A1).
17. *Streekstra H., Brocken P.J.M.* // Patent US. 2008. № 7470527.
18. *Streekstra H., Brocken P.J.M.* // Patent US. 2009. № 2009003342 (A1).
19. *Работнова И.Л., Позмогова И.Н.* Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. М.: Наука, 1979. 207 с.
20. *Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К.* // Успехи микробиологии. 1992. Т. 25. С. 126–142.
21. *Ratledge C.* *Biotechnology* / Eds. H. Kleinkauf, Von Dohren H. Weinheim: VCH, 1997. V. 7. P. 133–197.
22. *Botham P.A., Ratledge C.* // *J. Gen. Microbiol*. 1979. V. 114. № 2. P. 361–375.
23. *Boulton C.A., Ratledge C.* // *J. Gen. Microbiol*. 1981. V. 127. № 2. P. 169–176.
24. *Ratledge C., Evans C.T.* *The Yeasts* / Eds. Rose A.H., J.S. Harrison N.-Y.: Acad. Press, 1989. V. 3. P. 368–455.
25. *Zhang Y., Adams I.P., Ratledge C.* // *Microbiology*. 2007. V. 153. P. 2013–2025.
26. *Zhang Y., Ratledge C.* // *Mycol. Res*. 2008. V. 112. № 6. P. 725–730.
27. *Warude D., Joshi K., Harsulkar A.* // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2006. V. 26. № 2. P. 83–93.
28. *Sakuradani E., Ando A., Ogawa J., Shimizu S.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2009. V. 84. № 1. P. 1–10.
29. *Wynn J.P., Ratledge C.* // *Microbiology*. 2000. V. 146. № 9. P. 2325–2331.
30. *Parker-Barnes J.M., Das T., Bobik E., Leonard A.E., Thurmond J.M., Chaung L.T., Huang Y.S., Mukerji P.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 15. P. 8284–8289.
31. *Takeno S., Sakuradani F., Murata S., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., Shimizu S.* // *Lipids*. 2005. V. 40. № 1. P. 25–30.
32. *Jareonkitmongkol S., Kawashima H., Shirasaka N., Shimizu S., Yamada H.* // *Appl. Environ. Microbiol*. 1992. V. 58. № 7. P. 2196–2200.
33. *Kawashima H., Akimoto K., Higashiyama K., Fujikawa S., Shimizu S.* // *J. Amer. Oil Chem. Soc*. 2000. V. 77. P. 1135–1138.
34. *Дюкова В.И., Демчева Е.А., Ткачевская Е.П., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Конова И.В., Евстигнеева Р.П.* // Биотехнология. 2003. № 6. С. 17–23.
35. *Michaelson L.V., Lazarus C.M., Griffiths G., Napier J.A., Stobart A.K.* // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. № 30. P. 19055–19059.
36. *Damude H.G., Gillies P.J., Macool D.J., Picataggio S.K., Pollak D.M.W., Raghianti J.J., Xue Z., Yadav N.S., Zhang H., Zhu Q.Q.* // Patent US. 2006. № WO2006055322.
37. *Xue Z., Yadav N.S., Macool D.J.* // Patent US. 2006. № WO2006052814.
38. *Li Y.T., Li M.T., Fu C.H., Zhou P.P., Liu J.M., Yu L.J.* // *Biotechnol. Lett*. 2009. V. 31. № 7. P. 1011–1017.
39. *Shaw R.* // *Advances in Lipid Research* / Eds. R. Paoletty, D. Kritchevsky. N.-Y.: Acad. Press, 1966. V. 4. P. 107–174.
40. *Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Alderstein D., Cohen Z.* // *Lipids*. 2002. V. 37. № 2. P. 209–216.
41. *Cheng-Wu Z., Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Richmond A.* // *J. Appl. Phycol*. 2002. V. 14. P. 453–460.
42. *Kyle D.J.* // Patent US. 2008. № 7396548.

43. Галанина Л.А., Соловьева Н.Л., Конова И.В. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 4. С. 473–479.
44. Панькина О.И., Конова И.В. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 2. С. 177–181.
45. Галанина Л.А., Конова И.В. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 4. С. 480–484.
46. Галанина Л.А., Конова И.В. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 5. С. 636–641.
47. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Ткачевская Е.П., Конова И.В., Евстигнеева Р.П. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 2. С. 196–203.
48. Конова И.В., Галанина Л.А., Кочкина Г.А., Панькина О.И. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 5. С. 639–647.
49. Gandhi S.R., Weete J.D. // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. № 8. P. 1825–1830.
50. Милько А.А. Определитель мукооральных грибов. Киев: Наукова думка, 1974. 303 с.
51. Gams W. // Persoonia. 1977. V. 9. P. 381–391.
52. Shinmen Y., Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Yamada H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. № 1. P. 11–16.
53. Amano N., Shinmen Y., Akimoto K., Kawashima H., Amachi T. // Mycotaxon. 1992. V. 44. № 2. P. 257–265.
54. Eroshin V.K., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Zhelifonova V.P., Kurtzman C.P., Bothast R.J. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 12. № 1. P. 91–96.
55. Hou C.T. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 6. P. 501–506.
56. Barclay W.R. // Patent US. 2003. № 6541049.
57. Желифонова В.П., Зинченко Г.А., Белов А.П., Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 4–5. С. 610–616.
58. Zhu M., Long-Jiang Yu., Wei L., Peng-Peng Z., Chun-Yan L. // Enzyme Microbial Technol. 2006. V. 38. № 6. P. 735–740.
59. Bajpai P.K., Bajpai P., Ward O.P. // J. Ind. Microbiol. 1991. V. 8. № 3. P. 179–186.
60. Eroshin V.K., Satroudinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I. // Process Biochem. 2000. V. 35. № 10. P. 1171–1175.
61. Singh A., Ward O.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 1. P. 1–5.
62. Yu L.J., Qin W.M., Lan W.Z., Zhou P.P., Zhu M. // Bioresour. Technol. 2003. V. 88. № 3. P. 265–268.
63. Zhu M., Yu L.J., Liu Z., Xu H.B. // Lett. Appl. Microbiol. 2004. V. 39. № 4. P. 332–335.
64. Jang H.D., Lin Y.Y., Yang S.S. // Biores. Technol. 2005. V. 96. № 15. P. 1633–1644.
65. Higashiyama K., Fujikawa S., Park E.Y., Shimizu S. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2002. V. 7. P. 252–262.
66. Ho S.Y., Jiang Y., Chen F. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 10. P. 3960–3966.
67. Streekstra H. // J. Biotechnol. 1997. V. 56. № 3. P. 153–165.
68. Hempenius R.A., Van Delft J.M., Prinsen M., Lina B.A. // Food Chem. Technol. 1997. V. 35. P. 573–581.
69. Kendrick A., Ratledge C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. V. 37. P. 18–22.
70. Radwan S.S., Zriek M.M., Mulder J.L. // Mycol. Res. 1996. V. 100. P. 113–116.
71. Соловьева Н.Л., Конова И.В., Галанина Л.А., Бабанова Н.Л. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 4. С. 475–480.
72. Shirashi A., Kawashima H. // Patent JP (Japan). 2007. № WO2007091731.
73. Ho S.Y., Chen F. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 17. P. 7903–7909.
74. Myher J.J., Kuksis A., Geher K., Park P.W., Diersen-Schade D.A. // Lipids. 1996. V. 31. № 2. P. 207–215.
75. Lounds C., Eagles J., Carter A.T., MacKenzie D.A., Archer D.B. // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. № 4. P. 299–305.
76. Vane J.R. // Nature (New Biology). 1971. V. 231. № 5300. P. 232–235.
77. Botha A., Kock J.L.F., Coetzee D.J., Van Dyk M.S., Van Der Berg L., Botes P.J. // Syst. Appl. Microbiol. 1992. V. 15. P. 148–154.
78. Botha A., Paul I., Roux C., Kock J.L., Coetzee D.J., Strauss T., Maree C. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 3. P. 253–256.
79. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 31–36.
80. Галанина Л.А., Аганова Е.В. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 2. С. 205–210.
81. Takeno S., Sakuradani F., Tomi A., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., Shimizu S. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 9. P. 5124–5128.
82. Ochiai M., Kawashima H., Shimizu S. // Patent JP (Japan). 2006. № EP1666584.
83. Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Биологические науки. 1984. № 2. С. 5–16.
84. Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Успехи микробиологии. 1984. Т. 19. С. 221–235.
85. Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // Process Biochem. 1991. V. 26. № 1. P. 31–37.
86. Pedersen T.A. // Acta Chem. Scand. 1961. V. 15. P. 651–662.
87. Дедюхина Э.Г., Камзолова С.В., Ерошин В.К. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1007–1014.
88. Koike Y., Cai H.J., Higashiyama K., Fujikawa S., Park E.Y. // J. Biosci. Bioeng. 2001. V. 91. № 4. P. 382–389.
89. Stredanska S., Slugen D., Sted'ansky M., Grego J. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 9. P. 511–513.
90. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Peng C., Ren L.J., Liu X., Zhu H. // Food Ferm. Ind. 2007. V. 33. P. 52–54.
91. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Zhang K., Liu X., Li S., Peng C. // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 6. P. 1087–1091.
92. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Gao Z., Liu X., Peng C. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2009. V. 32. № 1. P. 117–122.
93. Shinmen Y., Yamada H., Shimizu S. // Patent JP (Japan). 1988. № EP0276541.
94. Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Shinmen Y., Yamada H. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989. V. 66. № 2. P. 237–241.

95. Shimizu S., Akimoto K., Shinmen Y., Kawashima H., Sugano L.M., Yamada H. // *Lipids*. 1991. V. 26. P. 512–516.
96. Park E.Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S., Okabe M. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. № 1. P. 61–67.
97. Hwang B.H., Kim J.W., Park C.Y., Park C.S., Kim Y.S., Ryu Y.W. // *Biotechnol. Lett.* 2005. V. 27. № 10. P. 731–735.
98. Lan W.Z., Qin W.M., Yu L.J. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. V. 35. № 4. P. 357–360.
99. Уэбб Э., Диксон М. Ферменты. М.: Мир, 1961. С. 165–234.
100. Failla M.L. *Microorganisms and minerals* / Ed. E.D. Weinberg. N.-Y.: Marcell Dekker, 1977. P. 152–213.
101. Speckhard D.C., Felica Y.H. Wu, Cheng-Wen Wu // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 5228–5234.
102. Naganuma T., Uzuka Y., Tanaka K., Iizuka H. // *J. Basic Microbiol.* 1987. V. 27. № 1. P. 35–42.
103. Дедюхина Э.Г., Крылова Н.И. // *Микробиология*. 1988. Т. 57. № 4. С. 586–590.
104. Sajbidor J., Kozelouhova D., Certik M. // *Folia Microbiol.* 1992. V. 37. № 4. P. 404–406.
105. Higashiyama K., Yaguchi T., Akimoto K., Fujikawa S., Shimizu S. // *JAOCS*. 1998. V. 75. № 11. P. 1501–1505.
106. Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis G. // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 97. № 4. P. 867–875.
107. Hansson L., Dostalek M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988. V. 28. P. 240–246.
108. Erwin J.H. *Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms* / Ed. J.A. Erwin. N.-Y.: Acad. Press, 1973. P. 41–143.
109. Linberg A., Molin G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. V. 39. P. 450–455.
110. Sakuradani E., Abe T., Iguchi K., Shimizu S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 6. P. 648–654.
111. Leman J., Brakoniecka-Sikorska A. // *Polish J. Food Nutr. Sci.* 1996. V. 46. P. 111–120.
112. Higashiyama K., Murakami K., Tsujimura H., Matsuoto N., Fujikawa S. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 63. P. 442–448.

Biosynthesis of Arachidonic Acid by Micromycetes (Review)

E. G. Dedyukhina^a, T. I. Chistyakova^a, and M. B. Vainshtein^{a, b}

^a *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

^b *Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

e-mail: dedeg@rambler.ru

Received April 12, 2010

Abstract—Arachidonic acid (ARA, 5,8,11,14-*cis*-eicosatetraenoic acid) is widely used in medicine, pharmaceuticals, cosmetics, dietary nutrition, agriculture, and other fields. Microbiological production of ARA is of increased interest since the natural sources (pig liver, adrenal glands, and egg-yolk) cannot satisfy its growing requirements. Mechanisms for ARA biosynthesis as well as the regulation of enzymes involved in this process are considered. Review summarizes literature data concerning individual stages of microbiological ARA production, methods for screening of active strains—producers, physiological regulation of ARA synthesis in micromycetes (the effect of growth phase, medium composition, pH, temperature, and aeration), and effective technologies of fermentation and the product recovery. Information on the whole biotechnological process from strain selection to the ARA yield improvement and purification of the end product is presented.