

УДК 582.282.123.2:547

БИОСИНТЕЗ ФУМИХИНАЗОЛИНОВ ГРИБОМ *Penicillium thymicola*

© 2012 г. В. П. Желифонова, Т. В. Антипова, А. Г. Козловский

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290;

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Биосинтез фумихиназолинов F и G (ФХ), РС-2 и пигментов грибом *P. thymicola* ВКМ FW-869 напрямую зависит от количества углеродного субстрата (маннит) в среде. При всех изученных концентрациях маннита преобладала продукция пигментов. Условием преимущественного биосинтеза ФХ грибом *P. thymicola* является лимитирование источником углерода (маннитом) и присутствие NaCl в среде культивирования гриба. NaCl оказывает регуляторное влияние на образование вторичных метаболитов, увеличивая биосинтез ФХ и снижая образование пигментов. Максимальные показатели биосинтеза ФХ и подавление продукции пигментов достигнуты при концентрации маннита в среде 20 г/л и 2.5% NaCl.

Мицелиальные грибы являются продуцентами биоактивных вторичных метаболитов, относящихся как к микотоксинам, так и к метаболитам, обладающих важными терапевтическими свойствами, которые нашли применение в медицине. К ним относятся хиназолиновые алкалоиды, встречающиеся у грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neosartorya*. Для хиназолиновых соединений в зависимости от заместителей показан разнообразный биологический эффект: болеутоляющий, противовоспалительный, антимикробный, бронхолитический, седативный, противоопухолевый и др. [1]. Представителями хиназолиновых алкалоидов являются фумихиназолины А-Г, образующиеся из антраниловой кислоты, триптофана и аланина. Их продуцируют некоторые штаммы грибов *Aspergillus fumigatus* и *Penicillium thymicola* [2, 3]. Фумихиназолины F и G обладают противораковой активностью на клетки лимфолейкоза Р 388 (ED₅₀ 13.5 мкг/мл и 13.8 мкг/мл соответственно) [2].

Ранее у штамма *P. thymicola* ВКМ FW-869, выделенного из образца криопэга возрастом 100–120 тыс. лет, были идентифицированы фумихиназолины F и G (ФХ) и метаболит поликетидной природы РС-2 (6-(1-гидроксипентил)-4-метоксипиранон) [4].

Цель работы – изучение влияния различных факторов на биосинтез фумихиназолинов F и G грибом *P. thymicola* ВКМ FW-869 и выявление условий, оптимальных для продуцирования этих метаболитов.

МЕТОДИКА

Использовали штамм *P. thymicola* ВКМ FW-869 из Всероссийской коллекции микроорганизмов

ИБФМ РАН (ВКМ). Гриб выращивали глубинным способом в 150 мл минеральной среды в колбах объемом 750 мл при 24 ± 1°C на качалке (220 об/мин). Постоянными компонентами среды были (г/л): янтарная кислота – 5.4, MgSO₄ · 7H₂O – 0.3, KН₂PO₄ – 1.0, рН доводили до 5.4 концентрированным раствором NH₄OH. Влияние концентрации маннита на продукцию вторичных метаболитов изучали при концентрации субстрата 10, 20, 30, 40 или 50 г/л. Поверхностное культивирование гриба и влияние ионов цинка (4.4 мг/л ZnSO₄ · 7H₂O) проводили на среде с 50 г/л маннита. Влияние 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 4.0 и 5.0% NaCl на рост и биосинтез вторичных метаболитов изучали при концентрации маннита 20 г/л. Дрожжевой экстракт (“Difco”, США) (0.1 г/л), KCl (0.5 г/л), повышенное количество янтарной кислоты (10.8 г/л) и ионов аммония вносили в среду с 20 г/л маннита и 2.5% NaCl. Влияние глюкозы, маннита, ксилозы, арабинозы, сахарозы, глицерина и этанола (8 г углерода на 1 л среды) на рост и продукцию вторичных метаболитов изучали в среде (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 3.0, KН₂PO₄ – 1.0, K₂HPO₄ – 0.1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.7. Этанол вносили дробно ежедневно (3 об. %). Засев сред осуществляли водной суспензией конидий (1–2 × 10⁷ спор/мл) 14-суточной культуры, выращенной на скошенном сусло-агаре. Рост штамма оценивали по сухой массе мицелия.

Метаболиты извлекали из фильтрата культуральной жидкости экстракцией хлороформом, а из мицелия – экстракцией метанолом. Метанольную вытяжку разбавляли дистиллированной H₂O в соотношении 1 : 10 и экстрагировали хлороформом. Хлороформные экстракты высушивали над Na₂SO₄ (безводный) и упаривали в вакууме. Ана-

Таблица 1. Содержание внутриклеточных и внеклеточных ФХ (мг/л) при глубинном и поверхностном культивировании *P. thymicola* на минеральной среде с 50 г/л маннита

Культивирование	Возраст мицелия, сут	Биомасса, г/л	Внутриклеточные		Внеклеточные		Суммарные	
			мг/л	q_6 , мг/г сут	мг/л	q_9 , мг/г сут	мг/л	q , мг/г сут
Глубинное	6	1.2	1.3	0.2	11	1.5	12.3	1.7
	10	1.8	6.5	0.7	40	4.0	46.5	4.7
	13	3.9	13	0.6	97	4.9	110	5.5
Поверхностное	10	1.6	8.3	0.5	33	2.1	41.3	2.6
	17	4.8	18	0.3	50	0.5	68.0	0.8

лиз экстрактов осуществляли методом тонко-слойной хроматографии на пластинках силикагеля (Silica gel 60 F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системах: хлороформ–метанол–25%-ный NH₄OH (конц.) (90 : 10 : 0.1) (I) и (80 : 20 : 0.2) (II). Вещества обнаруживали по поглощению в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивами Эрлиха для обнаружения индолсодержащих и Драгендорфа для идентификации азотсодержащих метаболитов.

Концентрацию метаболитов определяли спектрофотометрически (Specord UV VIS, “Carl-Zeiss Jena”, Германия): желтый пигмент (П-1) при 460 нм в смеси (1 : 1) фильтрата культуральной жидкости и карбонатного буфера (рН 10.3), желто-коричневых пигментов (П-2) при 365 нм в фильтрате культуральной жидкости. Концентрацию ФХ и РС-2 определяли после их выделения из хлороформного осадка с помощью препаративной ТСХ, в метаноле при 285 и 280 нм соответственно. Расчет производили, используя соответствующие калибровочные кривые.

Тоничность или осмоляльность сред (m_0) рассчитывали по формулам $m_0 = -128 \log a_w$; $a_w = N/(n + N)$; где a_w – активность воды, N – моли воды в растворе, n – моли растворенных веществ; для электролитов – вместо n подставляли vn , где v – число ионов на молекулу [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что накопление вторичных метаболитов в среде культивирования связано с процессами их экскреции из клеток и определяется прежде всего физико-химическими свойствами соединений, местом их биосинтеза и способом их выделения из клеток организмом-продуцентом. Ранее ФХ выделяли из мицелия *Aspergillus fumigatus* и *P. thymicola*, выращенных поверхностным способом на комплексных средах [2, 3, 6]. Нами было проведено изучение распределения ФХ между мицелием и культуральной жидкостью при глубинном и поверхностном культивировании штамма FW-869 на минеральной среде (маннит

50 г/л). У гриба, независимо от способа культивирования, основная часть ФХ от их общего количества находилась в культуральной жидкости (табл. 1). Так, при глубинном культивировании содержание внутриклеточных ФХ составило 12–14%, а при поверхностном культивировании – 25–35% от суммы ФХ. Причем при глубинном культивировании удельные скорости биосинтеза (q_6) и экскреции (q_9) ФХ были выше на 30 и 57% соответственно по сравнению с поверхностным ростом. Сравнение этих результатов с данными литературы [3] показало практически аналогичные значения для внутриклеточного содержания ФХ – 13 и 9 мг/л соответственно. Таким образом, наши результаты однозначно свидетельствовали, что наиболее эффективным является глубинное культивирование с последующим выделением ФХ из фильтрата культуральной жидкости.

Было обнаружено, что в процессе роста гриба *P. thymicola* в различных средах происходило окрашивание культуральной жидкости сначала в ярко-желтый, затем в насыщенный желто-коричневый цвет. Анализ экстрактов методом ТСХ показал присутствие одного желтого пигмента (R_f 0.7 (I)) и двух желто-коричневых пигментов (R_f 0.62 и 0.66 (II)). Все эти вещества не давали положительной реакции с реактивом Драгендорфа, что свидетельствовало об отсутствии азота в структуре соединений. УФ-спектр желтого пигмента (П-1) имел $\lambda_{\text{макс}}$ в областях 224, 302, 461 нм, а спектры желто-коричневых пигментов (П-2) были идентичны при 208, 274, 368, 446 нм. Близкие значения хроматографической подвижности желто-коричневых пигментов и одинаковый хромофор, указывает на то, что данные соединения имеют сходную структуру. Для пенициллов известен биосинтез пигментов разнообразной структуры, синтезирующихся из ацетил- и малонил-КоА по поликетидному пути [7].

Известно, что биосинтезу индолсодержащих метаболитов различной структуры способствуют среды, содержащие два источника углерода – кислоту цикла Кребса и медленно утилизируемый углевод, например янтарную кислоту и ман-

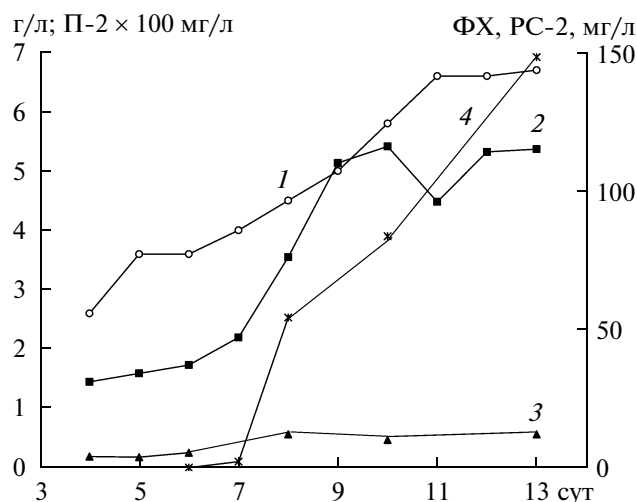


Рис. 1. Динамика роста и биосинтеза вторичных метаболитов при культивировании *P. thymicola* в среде с 50 г/л маннита:

1 — биомасса, г/л; 2 — ФХ, мг/л; 3 — РС-2, мг/л; 4 — П-2, мг/л.

нит [8]. Было изучено влияние различных концентраций маннита при постоянной концентрации других компонентов среды на рост и биосинтез метаболитов *P. thymicola*. Следует отметить, что маннит рассматривался не только как углеродный субстрат, но и как осмопротектор, так как тоничность сред изменялась от 0.28 до 0.50 осмолей. Рост гриба характеризовался диауксией, что свидетельствовало о последовательной утилизации углеродных субстратов (рис. 1). Влияние концентрации маннита на максимальные показатели роста и биосинтеза метаболитов *P. thymicola* представлены в табл. 2. Можно видеть, что биомасса возрастала до концентрации 30 г/л маннита в среде, а затем оставалась постоянной. Максималь-

ные значения удельной скорости роста гриба на сукцинате (μ_1) увеличивались до концентрации 40 г/л маннита, а далее не менялись, что свидетельствовало о влиянии тоничности среды на μ_1 . Оптимальная тоничность среды для роста на сукцинате была выше 0.45 осмолей. Максимальная удельная скорость роста на манните (μ_2) возрастала до концентрации 30 г/л маннита в среде. Дальнейшее увеличение маннита не влияло на содержание биомассы, но приводило к снижению μ_2 в 1.5 раза по сравнению с максимальным значением. Эти данные свидетельствуют о том, что маннит до концентрации 30 г/л является лимитирующим рост субстратом, а дальнейшее увеличение его концентрации в среде приводит к переключению на другой лимитирующий компонент среды. Для подтверждения этого в среду, содержащую 50 г/л маннита, вносили ионы цинка. Обнаружено увеличение в 1.6 раза биомассы (x) и μ_2 по сравнению с контролем, что свидетельствовало о наличии лимитирования по цинку.

В состав метаболома *P. thymicola* выращенного на этих средах входили ФХ, РС-2 и желто-коричневые пигменты (П-2). Динамика биосинтеза каждого из метаболитов имела свои особенности (рис. 1). Биосинтез ФХ проходил параллельно росту и имел циклический характер. Падение концентрации алкалоидов и снижение удельной скорости их накопления в культуральной жидкости наблюдалось во вторую лаг-фазу (5–6 сут) и в начале стационарной фазы роста (11 сут). Максимальная концентрация алкалоидов в культуральной жидкости наблюдалась в начале второй стационарной фазы роста. Поликетид РС-2 обнаруживался в культуральной жидкости одновременно с ФХ, и его содержание мало изменялось в процессе роста гриба. П-2 начинал синтезироваться в фазу активного роста гриба на манните с 7 сут, скорость

Таблица 2. Влияние концентрации маннита на максимальные показатели роста и биосинтеза метаболитов *P. thymicola*

Показатель	Маннит, г/л				
	10	20	30	40	50
Тоничность среды, осмоль	0.28	0.33	0.39	0.45	0.50
Биомасса, г/л	2.8	3.9	6.3	6.3	6.3
μ_1 , ч ⁻¹	0.003	0.005	0.008	0.018	0.018
μ_2 , ч ⁻¹	0.009	0.013	0.014	0.009	0.008
ФХ, мг/л	18	26	35	46	116
$Y_{\text{ФХ}/x}$, мг/г	6.4	6.6	5.6	7.3	18.4
РС-2, мг/г	1.8	7.9	5.9	7.3	12.0
$Y_{\text{РС-2}/x}$, мг/г	0.6	2.0	1.0	1.2	1.9
П-2, мг/л	48	528	595	662	692
$Y_{\text{П-2}/x}$, мг/г	17.1	135.4	94.4	105.1	109.8

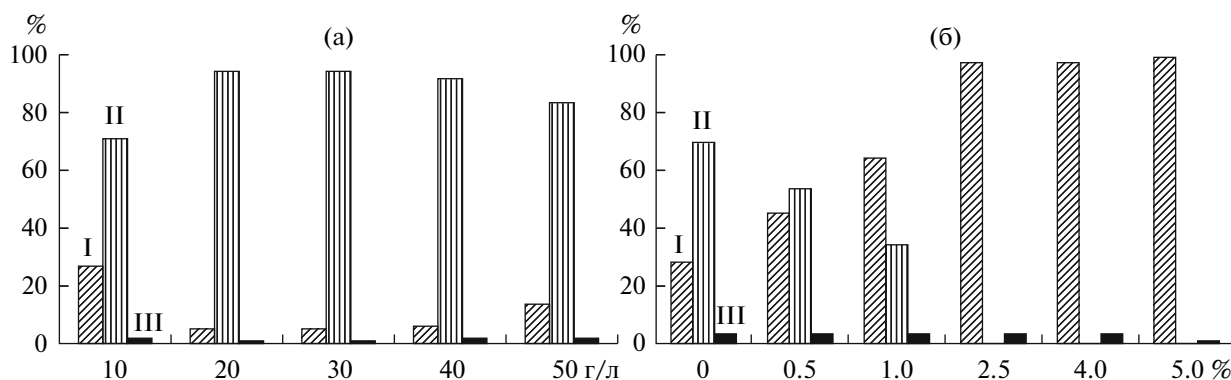


Рис. 2. Влияние концентрации маннита (г/л) (а) и NaCl (%) (б) на содержание метаболитов гриба *P. thymicola* (% от суммы метаболитов):
I – ФХ; II – П-2; III – РС-2.

его биосинтеза возрастала и в стационарную фазу достигала максимальных значений. Таким образом, динамика биосинтеза П-2 проходила по классической идиофазной модели, известной для различных вторичных метаболитов и, в том числе для пигментов [9].

Концентрация маннита в среде оказывала влияние на продукцию всех метаболитов (табл. 2). Максимальные значения показателей их биосинтеза получены при 50 г/л маннита. Содержание в культуральной жидкости ФХ, РС-2 и П-2 было выше в 6.4, 6.7 и 14.4 раза соответственно по сравнению с 10 г/л маннита. При всех изученных концентрациях маннита преобладал П-2 (71–84% от суммы метаболитов). Концентрация маннита оказывала влияние на соотношение метаболитов в экстракте (рис. 2а). Так, ФХ и П-2 при 50 г/л маннита составили 14 и 84%, а при 10 г/л маннита – 27 и 71% соответственно. Преимущественный биосинтез пигмента свидетельствовал об избытке углеродного субстрата в среде культивирования гриба *P. thymicola*. Известно, что образованию пигментов способствует избыток углеродного субстрата, присутствие в питательной среде ионов железа, меди, цинка и другие факторы [10]. Следует отметить, что при внесении ионов цинка в среду с 50 г/л маннита, концентрация пигментов и их выход на 1 г биомассы ($Y_{П-2/х}$) были выше в 3.5 и 2.3 раза соответственно, чем в контроле. Этот микроэлемент оказывал негативное влияние на биосинтез ФХ – концентрация и $Y_{ФХ/х}$ снижались в 1.5 и 2.4 раза соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, установлено, что у *P. thymicola* концентрация второго углеродного субстрата (маннит) оказывала регуляторное влияние как на количество синтезируемых метаболитов, так и на их соотношение.

Были изучены рост и биосинтез вторичных метаболитов грибом при различных концентрациях

NaCl в среде, не содержащей избытка углеродного субстрата (20 г/л маннита). Из результатов табл. 3 видно, что при увеличении концентрации NaCl происходило снижение биомассы, и при 5% NaCl она составила 70% от контроля. NaCl до 4% не повлиял на μ_1 , но при 5% NaCl наблюдалось снижение μ_1 . Зависимость удельной скорости роста на манните (μ_2) от концентрации NaCl имела вид куполообразной кривой с максимальным значением при 2.5% NaCl. Таким образом, при глубинном культивировании культура проявляла свойства умеренной галотолерантности.

Концентрация NaCl в среде оказывала влияние на биосинтез всех метаболитов (табл. 3). Было обнаружено, что при увеличении концентрации NaCl происходило снижение продукции метаболитов поликетидной природы (П-2, РС-2), а при концентрации свыше 2.5% П-2 не синтезировался вообще. Зависимость образования ФХ от концентрации NaCl имело куполообразную форму с максимумом при 2.5% NaCl. Причем в этих условиях содержание ФХ в культуральной жидкости достигло значений, наблюдаемых на среде с 50 г/л маннита (111 г/л). Концентрация NaCl оказывала регуляторное влияние как на количество синтезированных метаболитов, так и на их соотношение в экстракте (рис. 2б). При использовании NaCl в концентрации свыше 2.5% на долю ФХ приходилось 97–99, а в контроле 28%.

Ранее продуценты ФХ выращивали на комплексных средах, содержащих высокие концентрации дрожжевого экстракта, пептона, сахарозы или глюкозы [2, 6]. Нами было изучено влияние дрожжевого экстракта, KCl и повышенного количества янтарной кислоты и азота на рост и биосинтез метаболитов *P. thymicola* на минеральной среде, содержащей 20 г/л маннита и 2.5% NaCl. Внесение этих компонентов приводило к увеличению биомассы в 1.4, 1.5 или 2.2 раза соответственно по сравнению с контролем. Накопление

Таблица 3. Влияние концентрации NaCl на максимальные показатели роста и биосинтеза вторичных метаболитов *P. thymicola*

Показатель	NaCl, %					
	0	0.5	1.5	2.5	4.0	5.0
Тоничность среды, осмоль	0.33	0.66	0.84	1.18	1.75	2.15
Биомасса, г/л	3.8	3.5	3.1	3.0	2.9	2.7
μ_1 , ч ⁻¹	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001
μ_2 , ч ⁻¹	0.014	0.014	0.017	0.020	0.013	0.012
ФХ, мг/л	57	84	90	111	84	79
$Y_{ФХ/х}$, мг/г	15.0	24.0	29.0	37.0	29.0	29.3
РС-2, мг/л	4.4	3.8	3.5	3.0	2.3	0.6
$Y_{РС-2/х}$, мг/г	1.1	1.1	1.1	1.0	0.8	0.2
П-2, мг/л	141	101	48	0	0	0
$Y_{П-2/х}$, мг/г	37.1	28.9	15.5	—	—	—

ФХ в среде с KCl возросло на 24% по сравнению с контрольной средой, при этом выход ФХ от биомассы ($Y_{ФХ/х}$) был ниже контроля на 26%. На средах с дрожжевым экстрактом и повышенным по сравнению с контрольной средой количеством янтарной кислоты и азота продукция ФХ была ниже контроля в 1.8 и 12.0 раз, а $Y_{ФХ/х}$ в 2.5 и 26.9 раз соответственно. Кроме того, на среде с повышенным количеством янтарной кислоты и азота наблюдался биосинтез П-2 (54 мг/л), несмотря на наличие в среде 2.5% NaCl.

Было установлено, что *P. thymicola* способен использовать в качестве единственного источника углерода и энергии глюкозу, маннит, ксилозу, арабинозу, сахарозу, глицерин и этанол. У культуры значения выхода биомассы от использованного углерода (Y_c) соответствовали данным, известным для этих субстратов [5]. Состав метаболитов при росте на углеводах и глицерине был идентичен и состоял из ФХ, РС-2 и желтого пигмента (П-1). При использовании культурой этанола биосинтез П-1 не происходило, что, возможно, связано как с особенностью метаболизма этого субстрата, так и с отсутствием его избытка в среде из-за дробного внесения в процессе культивирования гриба. В этих экспериментах в зависимости от источника углерода количество ФХ составило 5–15 мг/л, а метаболитов поликетидной природы (П-1, РС-2) – 55–148 мг/л. Биосинтез алкалоидов проходил параллельно росту гриба. Таким образом, показано, что у *P. thymicola* ферменты биосинтеза ФХ конститутивны, и глюкоза не является катаболическим репрессором их биосинтеза. Для более эффективного биосинтеза ФХ требуется присутствие второго углеродного субстрата – янтарной кислоты.

Известно, что геном мицелиальных грибов содержит кластеры генов, ответственных за образо-

вание вторичных метаболитов. В биосинтез вторичных метаболитов вовлечены мультифункциональные ферменты: поликетидсинтаза (ПКС), нерибосомальная пептидсинтаза (НРПС) и гибридная ПКС-НРПС. Недавно у *A. fumigatus* был охарактеризован кластер генов, контролирующих биосинтез фумигиназолинов А-Г, состоящий из 8 генов [11]. Трехмодульная антранилатзависимая НРПС (Afl2080) осуществляет биосинтез фумигиназолинов F и G, остальные домены активируют дальнейшее превращение этих метаболитов. Можно предположить, что в геноме штамма *P. thymicola* ВКМ FW-869 содержится только НРПС, ответственная за биосинтез ФХ. Присутствие метаболитов поликетидной природы у данного штамма указывает на наличие ПКС в геноме гриба.

Таким образом, культура *P. thymicola* ВКМ FW-869 проявляла осмоотолерантность в исследованном диапазоне концентрации маннита (10–50 г/л). По результатам изучения влияния концентрации NaCl (0.5–5.0%) на рост штамма можно отнести к умеренным галофилам. Установлена прямая зависимость между концентрацией маннита в среде и биосинтезом пигментов. Их преимущественный биосинтез культурой (73–95%) связан с избытком углеродного субстрата в среде. Показано, что концентрация NaCl выше 2.5% оказывает негативное влияние на биосинтез пигментов. Установлена прямая зависимость между концентрацией NaCl в среде и биосинтезом ФХ. Максимальные показатели биосинтеза алкалоидов и подавление продукции пигментов достигнуты при концентрации в среде 20 г/л маннита и 2.5% NaCl.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического

комплекса России на 2007–2013 годы” (контракт 16.518.11.7035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vijaychand A., Manjula S.N., Bharath E.N. Divya B.* // Int. J. Pharm. and Biosci. 2011. V. 2. № 1. P. 780–809.
2. *Takahashi C., Matsushita T., Doi M., Minoura K., Shingu T., Kumeda Y., Numata A.* // J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1. 1995. № 18. P. 2345–2353.
3. *Larsen T.O., Frydenvang K., Frisvad J.C., Christophersen C.* // J. Nat. Prod. 1998. T. 61. № 9. P. 1154–1157.
4. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М.* // Микробиология. 2012 (в печати).
5. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
6. *Svendson J.A., Frisvard J.C.* // Mycol. Res. 1994. V. 98. P. 1317–1328.
7. *Samson R.A., Frisvad J.C.* // Stud. Mycol. 2004. № 49. P. 1–143.
8. *Rehacek Z., Sajdl P.* Ergot alkaloids. Chemistry, biological effect, biotechnology. Praha: Academia, 1990. 383 p.
9. *Betina V.* // Folia Microbiol. 1995. V. 40. № 1. P. 51–67.
10. *Medentsev A.G., Akimenko V.K.* // Phytochemistry. 1998. V. 47. № 6. P. 935–959.
11. *Brian D. A., Xinyu L., Christopher T.W.* // Biochemistry. 2010. V. 49. № 39. P. 8564–8576.

Biosynthesis of Fumiquinazolines by the Fungus *Penicillium thymicola*

V. P. Zhelifonova, T. V. Antipova, and A. G. Kozlovskii

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Received October 3, 2011

Abstract—Biosynthesis of fumiquinazolines F and G (FQs), PC-2, and pigments by the fungus *P. thymicola* VKM FW-869 is directly dependent on the content of carbon substrate (mannitol) in the medium. Pigment production prevailed at all of the tested mannitol concentrations. The necessary conditions for predominant FQ biosynthesis by the fungus *P. thymicola* are carbon source (mannitol) limitation and presence of NaCl in the cultivation medium. NaCl has a regulatory effect on the formation of secondary metabolites by enhancing FQ biosynthesis and reducing pigment formation. The maximum values of FQ biosynthesis and inhibition of pigment production are obtained at a mannitol concentration of 20 g/l and 2.5% NaCl in the medium.