

О МЕТОДИЧЕСКИХ АСПЕКТАХ СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ ЭФИРНОГО МАСЛА РОЗОВОГО НАПРАВЛЕНИЯ ЗАПАХА

Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка

ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет»

Поступила в редакцию 30.08.2013 г.

Аннотация. Предложены методические подходы для скрининга высокоактивных вариантов (форм) с определенным содержанием в синтезируемой смеси индивидуальных биологически активных соединений. Указанные подходы реализованы в селекции производственных штаммов *Eremothecium* - продуцента эфирного масла с запахом розы.

Ключевые слова: эремотеций, роза эфирномасличная, селекция, эфирное масло, биологически активные соединения.

Abstract. Methodological approaches for the screening of highly active variants (forms) with a certain content of individual biologically active substances in a synthesized mixture were suggested. The shown approaches were realised in strains of *Eremothecium*, producer of essential oil with a rose flavour.

Keywords: *Eremothecium*, oil-bearing rose, selection, essential oil, biologically active substances.

В связи с быстрым развитием промышленности и растущим интересом к биотехнологическим подходам в решении актуальных задач производства возникает необходимость в поиске новых продуцентов биологически активных соединений (БАС) [1, 2]. Особое внимание привлекают микроорганизмы, способные синтезировать смесь веществ, представляющих ценность для человека, например, антибиотики, витамины, функциональные полисахариды, ферменты, летучие душистые соединения и др. [3]. Скрининг продуцентов комплекса БАС выявляет потребность в новых методических подходах, которые позволили бы значительно интенсифицировать процесс отбора высокоактивных вариантов [4, 5], штаммов продуцента, полученных как классической селекцией, так и генно-инженерными способами. Модельным объектом для разработки алгоритма создания производственных культур с требуемой совокупностью показателей по уровню накопления нескольких индивидуальных соединений может служить дрожжеподобный гриб эремотеций [6, 7]. Целевые продукты биотехнологий, в кото-

рых продуцентами являются микромицеты рода *Eremothecium*, - это биологически активные соединения: рибофлавин и его производные, а также эфирное масло и другие аромапродукты [1, 3]. Эфирное масло *Eremothecium* представляет собой смесь летучих душистых веществ, в основном, монотерпеновых спиртов (МТС): гераниола, нерола, цитронеллола и ароматического спирта - β -фенилэтанола (ФЭС) [2-7]. Следует отметить, что геранилпирофосфат является предшественником всех МТС, содержащихся в розовом и эремотецевом маслах (рис. 1) [8-10]. При этом, реакция превращения геранилпирофосфата в нерилпирофосфат является обратимой, что затрудняет селекционную работу по получению детерминантных по неролу штаммов. В связи с этим необходима разработка новых методических подходов скрининга продуцентов многокомпонентной смеси заданного состава БАС.

Целью данного исследования является разработка методического подхода для селекции производственных штаммов с определенным содержанием в синтезируемой смеси индивидуальных БАС на примере *Eremothecium* - продуцента эфирного масла.

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей компонентного состава розового масла и эфирного масла из БТС *Eremothecium*

Источник масла	Доля МТС, %	Соотношение ФЭС/МТС
<i>E. ashbyi</i>		
ВКПМ F-6	78.16-81.10	0.23-0.28
ВКПМ F-36	71.96-81.70	0.22-0.39
ВКПМ F-108	42.40-60.40	0.66-1.36
ВКПМ F-340	81.02-89.82	0.11-0.23
ВКМ F-124	77.70-88.00	0.11-0.28
ВКМ F-1397	54.70-57.30	0.75-0.83
ВКМ F-3009	87.80-96.70	0.02-0.12
<i>E. gossypii</i>		
ВКПМ F-35	39.70-82.00	0.22-1.52
ВКМ F-1398	56.30-74.40	0.34-0.69
ВКМ F-2627	44.00-47.00	1.12-1.27
ВКМ F-3276	43.60-55.90	0.79-1.29
ВКМ F-3296	47.90-49.90	1.00-1.09
<i>Rosa damascena</i> Mill. (ISO 9842:2003)	35.00-81.00	0.04-0.08

анализированные образцы сырья видов *E. ashbyi* и *E. gossypii* значительно варьировали по количеству ароматообразующих соединений (АОС) в л КЖ (50.9...565.5 мг/л). Полученные данные дают возможность определить для каждой культуры взаимосвязи между содержанием эфирного масла в сырье и биотехнологическими параметрами (состав питательной среды, объем вносимого посевного материала, время ферментации и др.), что позволяет регулировать процесс культивирования продуцента для достижения необходимых значений по уровню накопления летучих душистых веществ и выявить показатели для стандартизации БТС *Eremothecium*. Так, например, одни из наивысших значений были отмечены у культуральных жидкостей *E. gossypii* (565.5 мг/л, 50 ч культивирования) и *E. ashbyi* (376.0 мг/л, 64 ч культивирования).

По компонентному составу ближайшим «растительным» аналогом является розовое масло, одно из самых дорогостоящих и высоко востребованных масел в мире, поэтому целесообразно при отборе высокоактивных вариантов использовать показатели, регламентируемые нормативной документацией на розовое масло. Одним из показателей качества эфирного масла розы является содержание ФЭС и суммы терпеновых спиртов (гераниола, цитронеллола, нерола), поэтому соотношение этих компонентов является важным критерием отбора продуцента. В качестве эталона сравнения (0.04...0.08) использовалось соотношение ФЭС к сумме терпеновых спиртов розового масла, рассчитанное на основании показателей международного стандарта ISO 9842:2003. В соответствии с этим содержание фенилэтанола, увеличение которого чаще всего ведет к снижению качества масла, должно быть более низким по сравнению с отечественным стандартом ОСТ 10-60-87. Было выявлено (табл. 1), что по указанному соотношению наиболее приближено к нему эфирное масло, получаемое из 48...54-часовой культуральной жидкости *E. ashbyi* штаммов ВКПМ F-340 (0.11), ВКМ F-3009 (0.12).

Однако, для более точного и полного скрининга высокоактивных штаммов продуцента эфирного масла с определенным содержанием индивидуальных соединений использование одного показателя для комплексной оценки биосинтетической способности микроорганизма недостаточно, поэтому предлагается дополнительное использование соотношений отдельных монотерпеновых спиртов между собой, а именно гераниола к цитронеллолу, гераниола к неролу.

В качестве эталона сравнения (0.13...1.12 и 0.55...7.67 соответственно) служили соотношения, рассчитанные на основании данных международного стандарта ISO 9842:2003 по розовому маслу различного происхождения. В отличие от отечественного стандарта он регламентирует процентное содержание отдельных компонентов. При анализе образцов эфирного масла, полученного в результате ферментации штаммов продуцентов, было установлено полное соответствие только по соотношению гераниола к неролу (ВКМ F-124 – 6.96; ВКПМ F-36 – 3.65...6.54); лучшее значение показателя по соотношению гераниола к цитронеллолу было отмечено у штамма ВКПМ F-36 – 2.51 (табл. 2).

Ступенчатый скрининг отдельных колоний (вариантов) из популяций этого штамма позволил максимально приблизиться к требованиям международного стандарта (гераниол к цитронеллолу – 0.13...1.12, гераниол к неролу – 0.55...7.6).

Полученные результаты свидетельствуют, что использование подхода, основанного на расчете соотношений компонентов как одинаковой, так и разной химической структуры, позволяет более точно и полно провести анализ биосинтетической способности продуцента, выявить штамм или вариант с наиболее желательным составом смеси БАС и специфицировать направление селекционного отбора.

При скрининге видов и штаммов, синтезирующих эфирное масло, подобный подход об-

Сравнительная характеристика розового и эремотецевого масел по соотношению основных монотерпеновых спиртов

Источник масла	Соотношение гераниол/цитронеллол	Соотношение гераниол/нерол
<i>E. ashbyi</i>		
ВКПМ F-6	8.98-26.10	не обнаружен нерол
ВКПМ F-36	2.51-7.04	3.65-68.20
ВКПМ F-108	31.46-365.5	не обнаружен нерол
ВКПМ F-340	37.62-51.94	не обнаружен нерол
ВКМ F-124	12.43-16.65	6.96-12.21
ВКМ F-1397	1.21-47.33	7.67-142.00
ВКМ F-3009	9.12-15.30	13.6-24.65
<i>E. gossypii</i>		
ВКПМ F-35	не обнаружен цитронеллол	не обнаружен нерол
ВКМ F-1398	18.56-232.30	50.6-697.00
ВКМ F-2627	13.92-77.33	6.96-34.72
ВКМ F-3276	7.76-13.21	4.79-26.42
ВКМ F-3296	0.47-22.63	2.42-99.60
<i>Rosa damascena</i> Mill. (ISO 9842:2003)	0.13-1.12	0.55-7.67

легчает задачу по поиску микроорганизма с требуемыми показателями по химическому составу комплекса биологически активных веществ и по сравнению с традиционным подходом позволяет установить взаимозависимости по уровню биосинтеза и накопления индивидуальных соединений, а также, в частности, процесса биотрансформации геранилпирофосфата в нерол и цитронеллол (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемые методические подходы отбора высокоактивных вариантов продуцентов комплекса БАС являются универсальными и представляют интерес при скрининге биосинтетической активности микроорганизмов, полученных как путем классической селекции, так генно-инженерными способами. Расчет соотношений компонентов как одинаковой, так и разной химической природы позволяет определить качественные и количественные взаимозависимости индивидуальных соединений и биотехнологических процессов при их оптимизации и может быть использован в технокимическом контроле производства и оценке качества продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпичка А.И. К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье / А.И. Шпичка, Е.Ф. Семенова, А.В. Кузнецова

// Современные проблемы науки и образования. — 2011. — № 1. — С. 30-32.

2. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. / Е.Ф. Семенова // Известия вузов. Поволжский регион. Серия «Медицинские науки». — 2007. — № 4. — С. 44-50.

3. Semenova E.F. About essential oils biotechnology on the base of microbial synthesis / E.F. Semenova, A.I. Shpichka, I.Ya. Moiseeva // European Journal Of Natural History. — 2012. — № 4. — P. 29-31.

4. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф. Душистые вещества мицелиального гриба *Ashbya gossypii* / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова // Химия природных соединений. — 1991. — № 3. — С. 428.

5. Семенова Е.Ф. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства видов рода *Eremothecium* / Е.Ф. Семенова, А.И. Шпичка, И.Я. Моисеева // Фундаментальные исследования. — 2011. — № 6. — С. 210-214.

6. Semenova E.F. Some pharmbiotechnological characteristics of *Eremothecium*, producer of riboflavin and essential oil / E.F. Semenova, A.I. Shpichka // International journal of applied and fundamental research. — 2012. — № 1. — P.170-172.

7. Semenova E.F. About explanation of elaboration of essential *Eremothecium* oil

biotechnology / E.F. Semenova, A.I. Shpichka, I.Ya. Moiseeva // International journal of experimental education. — 2012. — №3. — P. 35-36.

8. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells/ F. Bouvier [et al.] //The Plant Journal. — 2000. — Vol. 24. — № 2. — P. 241-252.

9. Bouvier F. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids / F. Bouvier, A. Rahier, B. Camara // Progress in Lipid Research. — 2005. — Vol. 44. — P. 357-429.

10. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast / F.M. Carrau [et al.] // FEMS Microbiology Letters. — 2005. — Vol. 243. — P. 107-115.

Семенова Елена Федоровна — к.б.н., с.н.с., доцент кафедры «Общая и клиническая фармакология» медицинского института ФГБОУ ВПО «Пензенского государственного университета»; (8412) 36-84-67; e-mail: sef1957@mail.ru

Semenova Elena F. — PhD (Biology), the senior researcher, Associate professor of General and Clinical Pharmacology Department of Medical Institute of Penza State University; (8412) 36-84-67; e-mail: sef1957@mail.ru

Шпичка Анастасия Иосифовна — к.б.н., кафедра «Общая и клиническая фармакология» медицинского института ФГБОУ ВПО «Пензенского государственного университета»; (8412) 36-84-67; e-mail: ana-shpichka@yandex.ru.

Shpichka Anastasia I. — PhD (Biology), General and Clinical Pharmacology Department of Medical Institute of Penza State University; (8412) 36-84-67; e-mail: ana-shpichka@yandex.ru.