

УДК 579.222.3+579.262+579.64

*Рузиева Д.М., Расулова Г.А.,
Лобанова К.В., Каримова Ф.А., Гулямова Т.Г.*

Институт микробиологии АН Республики Узбекистан (г. Ташкент)

СИНТЕЗ ЛОВАСТАТИНА НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ *ASPERGILLUS TERREUS*

D. Ruzieva, G. Rasulova, K. Lobanova, F. Karimova, T. Gulyamova
Uzbekistan Academy of Science, Microbiology Institute, Tashkent

LOVASTATIN PRODUCTION BY *ASPERGILLUS TERREUS* ON DIFFERENT SUBSTRATES IN SOLID-PHASE FERMENTATION

Аннотация. Показана возможность твердофазной ферментации местных штаммов *A. terreus* 4 и *A. terreus* 20 на различных субстратах со значительным выходом ловастатина. Наибольший рост продуцентов и максимум накопления статина в обоих штаммах на всех субстратах наблюдается на 11 сутки ферментации. Уровень продукции ловастатина в штамме *A. terreus* 4 выше, чем в *A. terreus* 20. Установлено, что уровень биосинтеза ловастатина в *A. terreus* 4 при использовании овса в качестве твердого субстрата существенно превосходит все остальные использованные субстраты и максимальное количество составило 4,32 мг/г сухого субстрата при экстракции метанолом.

Ключевые слова: *Aspergillus terreus*, твердофазная ферментация, биосинтез, ловастатин.

Abstract. We report the possibility of solid-phase fermentation of local strains *A. terreus* 4 and *A. terreus* 20 on different substrates with a significant yield of lovastatin. The greatest growth of producers and maximum accumulation of statins in both strains on all the substrates is observed on the 11 day of fermentation. The level of lovastatin production in the strain *A. terreus* 4 is higher than in *A. terreus* 20. It is found that the level of biosynthesis of lovastatin in *A. terreus* 4 when using oats as a solid substrate considerably exceeds all other substrates used. The maximum quantity is equal to 4.32 mg/g of dry substrate when the methanol extraction is employed.

Key words: *Aspergillus terreus*, solid-phase fermentation, biosynthesis lovastatin.

В настоящее время твердофазная ферментация (ТФФ) очень быстро завоевывает промышленное производство ловастатина как альтернативная стратегия. Ряд сравнительных исследований показал, что твердофазная ферментация имеет много преимуществ, в том числе более быстрый и более высокий уровень продукции, низкую стоимость субстратов и малые энергетические затраты. Метод ТФФ широко применяется для получения микробных ферментов, антибиотиков, иммуносупрессантов [2; 5; 6].

Нами были выделены местные штаммы *A. terreus*, синтезирующие достаточно высокие количества ловастатина в условиях глубинного культивирования. Целью данной работы явилось изучение накопления ловастатина при твердофазной ферментации *A. terreus* как альтернативного метода получения ловастатина для сравнительной оценки синтетического потенциала отобранных местных штаммов.

Материалы и методы

Микроскопический гриб *A. terreus* выделен и идентифицирован из почвенного образца Навоийской области Узбекистана. Культуру выращивали на среде Чапека-Докса при 28-30°C в течение 7 дней до завершения процесса споруляции. Споры смывали стерильной водой с 2% Твин-20 [4].

© Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Лобанова К.В., Каримова Ф.А., Гулямова Т.Г., 2013.

Твердофазную ферментацию проводили на чашках Петри, содержащих 5 г увлажненного субстрата, состоящего из природных зерновых субстратов – пшеницы, овса, риса, кукурузы, комбикорма и смеси пшеницы с арахисом в соотношении 1:1. Чашки с субстратом автоклавировали 40 мин при 121°C, измеряли влажность субстрата после автоклавирования, затем увлажняли субстрат до 55-65% средней следующего состава: глюкоза – 11% (w/v), глицерин – 16%, $MgSO_4$ – 0,75%, $(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3%(w/v), KH_2PO_4 – 2%, мальтоза – 5%, pH 7,5. На подготовленный субстрат нанесли 2,5 мл инокулюма, содержащего 10^7 - 10^8 спор/мл. Инкубировали посевы при 28°C в течение 7 и 10 суток. В конце ферментации 1 г культуры экстрагировали 20 мл растворителя, затем центрифугировали 20 мин при 6 тыс об/мин. Для экстракции использовали метанол, этилацетат и ацетонитрил.

Для определения влажности 1 г ферментируемого субстрата взвешивали (W1), затем высушивали при 100⁰-105°C до абсолютно сухого веса (W2). Содержание влаги ферментационного субстрата вычисляли по формуле: влажность = (W1) - (W2) / (W1) * 100%.

Концентрацию ловастатина определяли методом ВЭЖХ на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18. (4,6*150 мм, 5 μm) в сравнении со стандартом ловастатина (Gedeon Richter). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и 0,1% фосфорную кислоту в соотношении 60:40 при скорости потока 1,5 мл/мин и длине волны УФ-детектора 238 нм [1; 3; 7].

Результаты и обсуждение

Для скрининга подходящего твердого субстрата для местных штаммов *A. terreus* были включены измельченные зерна пшеницы, смесь пшеницы с арахисом (1:1), риса, овса, кукурузы и комбикорма. Изучение влияния продолжительности твердофазной ферментации на выход ловастатина отслеживали на

7-е, 10-е и 14 сутки от начала культивирования, используя различные растворители для экстракции искомого вещества. На рис. 1-6 представлены данные, отражающие динамику накопления ловастатина при ферментации *A. terreus* 20 и *A. terreus* 4 на указанных субстратах.

Как видно из представленных данных, все использованные субстраты вполне подходят для успешного развития мицелия обеих культур. Наибольший рост продуцентов и максимум накопления статина в обоих штаммах на всех субстратах наблюдается на 11 сутки ферментации. В целом уровень продукции ловастатина в штамме *A. terreus* 4 выше, чем в *A. terreus* 20. Из полученных данных видно, что уровень биосинтеза ловастатина в *A. terreus* 4 при использовании овса в качестве твердого субстрата существенно превосходит все остальные использованные субстраты. Так, его максимальное количество составило 4,32 мг/г сухого субстрата при экстракции метанолом. При ферментации *A. terreus* 20 на том же субстрате количество продукта было заметно ниже – 2,15 мг/г, 2,5 мг/г и 1,35 мг/г при экстракции ацетонитрилом, этилацетатом и метанолом, соответственно.

При сравнении содержания ловастатина, экстрагированного тремя растворителями, видно также, что наиболее полный выход ловастатина почти из всех ферментированных субстратов в случае *A. terreus* 20 обеспечивает экстракция этилацетатом, в то время как из субстратов ферментации *A. terreus* 4 наибольшее количество продукта извлекается с помощью ацетонитрила, за исключением ферментации на овсе. Ловастатин из ферментированного овса хорошо экстрагируется и ацетонитрилом, и метанолом. Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что местные штаммы *A. terreus* 20 и *A. terreus* 4 обладают высоким потенциалом для продукции твердофазной ферментацией, и могут составить основу для разработки новой импортозамещающей технологии получения препарата.

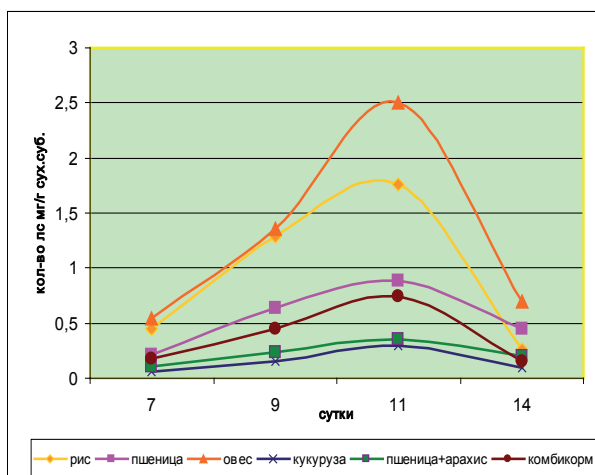


Рис. 1. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 4 на различных субстратах (экстракция этилацетатом)

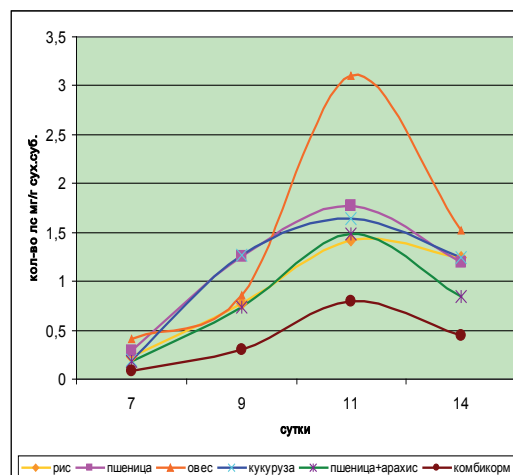


Рис. 2. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 4 на различных субстратах (экстракция ацетонитрилом)

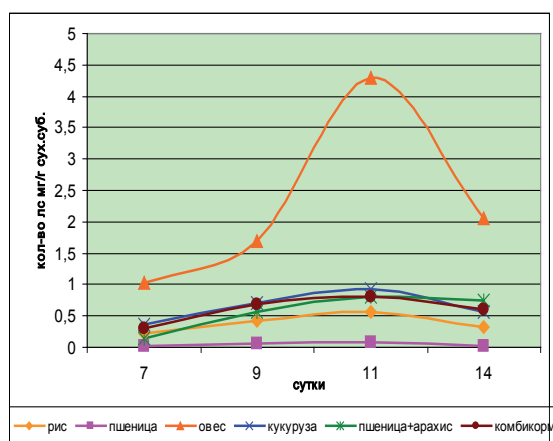


Рис. 3. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 4 на различных субстратах (экстракция метанолом)

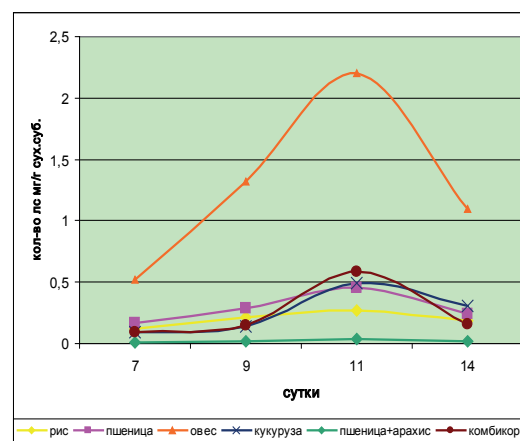


Рис. 4. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 20 на различных субстратах (экстракция ацетонитрилом)

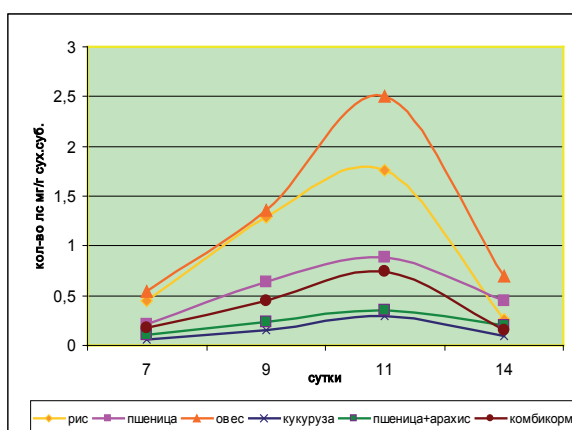


Рис. 5. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 20 на различных субстратах (экстракция этилацетатом)

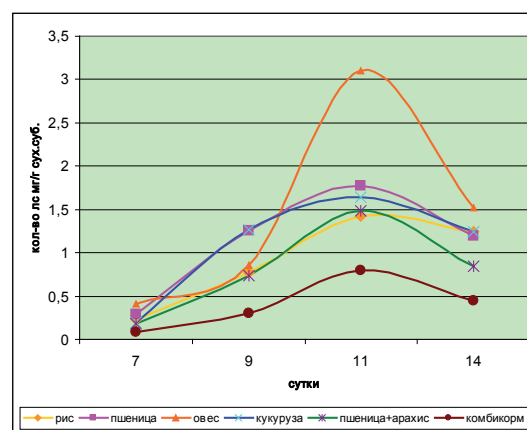


Рис. 6. Динамика накопления ловастатина грибом *A. terreus* 20 на различных субстратах (экстракция метанолом)

ЛИТЕРАТУРА:

1. ГОСТ 15113.4-77: межгосударственный стандарт. Концентраты пищевые. Методы определения влаги / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии [сайт]. URL: <http://protect.gost.ru/document.aspx?control=7&id=158130> (дата обращения 17.04.2013).
2. Adinarayana K. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum* / K. Adinarayana, T. Prabhakar, V. Srinivasulu et al. // Process Biochem. – 2003. – V. 39 (№ 2). – P. 171–177.
3. Banos J.G. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support / J.G. Banos, A. Tomasini, G. Szakacs et al. // J. of Bioscience and Bioengineering. – 2009. – V. 108 (№ 2). – P. 105–110.
4. Casas Lopez J.L. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus* / Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M. et al. // J. of Biotechnol. – 2005. – № 116. – P. 61–77.
5. Gombert A.K. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation using babassu oil cake as substrate / A.K. Gombert, A.L. Pinto, L.R. Astilho et al. // Process Biochem. – 1999. – V. 35 (№ 1-2). – P. 85–90.
6. Ramana Murthy M.V., Mohan E.V.S., Sadhukhan A.K. Cyclosporin-A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation // Process Biochem. – 1999. – V. 34 (№ 3). – P. 269–280.
7. Wei Pei-lian, Xu Zhi-nan, Cen Pei-lin. Lovastatin production by *aspergillus terreus* in solid-state fermentation // J. of Zhejiang University SCIENCE A. – 2007. – V. 8 (№ 9). – P. 1521–1526.