ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 606:57.083.13
EDN: UENDIX
DOI: 10.21285/achb.981

Оптимизация питательной среды для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – продуцента *β*-каротина

В.В. Ядерец✉, Н.В. Карпова, Е.В. Глаголева, В.А. Цыганов, А.С. Шибаева, В.В. Джавахия

Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Российская Федерация.

Аннотация. *Известно, что наибольшее влияние на биосинтез β-каротина Mycolicibacterium neoaurum AC-3067D оказывает замена глюкозы на глицерин. В то же время с технологической точки зрения наличие остаточного глицерина затрудняет процесс сушки биомассы, на основе которой может быть разработана кормовая добавка для сельскохозяйственных птиц и животных. Цель работы заключалась в определении количества глицерина, глюкозы и Твин-80 методом математического планирования (полный факторный эксперимент типа 2^3) и апробации подобранной питательной среды при глубинном культивировании Mycolicibacterium neoaurum в ферментационной установке объемом 3 л. В ходе проведенного исследования осуществлена оценка накопления биомассы Mycolicibacterium neoaurum и содержания в ней β-каротина при замене глицерина (20 г/л) на комбинацию глицерина (10 г/л) и глюкозы (10 г/л). Установлено, что при культивировании Mycolicibacterium neoaurum в среде, содержащей комбинацию глицерина и глюкозы, продуктивность штамма по биомассе и β-каротину сопоставима с контрольными условиями и составляет 17,8 г/л и 182,5 мг/кг соответственно. Исследование также показало, что внесение Твин-80 (1 г/л) в питательную среду увеличило выход биомассы и β-каротина на 14,0 и 32,2% соответственно по сравнению с контролем. Установлено, что при выращивании Mycolicibacterium neoaurum в биореакторе с использованием ростовой среды, состав которой рассчитан с использованием полного факторного эксперимента типа 2^3, содержащей глицерин (15,0 г/л), глюкозу (5,0 г/л) и Твин-80 (1,5 г/л), продуктивность штамма по β-каротину составила 376,5 мг/кг, по биомассе – 25,2 г/л.*

Ключевые слова: *каротиноиды, Mycolicibacterium neoaurum, биосинтез, культивирование, биореактор*

Финансирование. *Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 123012000071-1).*

Для цитирования: Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Цыганов В.А., Шибаева А.С., Джавахия В.В. Оптимизация питательной среды для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – продуцента *β*-каротина // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 252–261. DOI: 10.21285/achb.981. EDN: UENDIX.

© Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Цыганов В.А., Шибаева А.С., Джавахия В.В., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Optimization of culture medium for submerged cultivation of *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – a beta-carotene producing strain

Vera V. Yaderets✉, Natalya V. Karpova, Elena V. Glagoleva, Vladimir A. Tsyganov, Alexandra S. Shibaeva, Vahtang V. Dzhavakhiya

Russian Biotechnological University (BIOTECH University), Moscow, Russian Federation

Abstract. *The replacement of glucose with glycerol has demonstrated the most significant influence on beta-carotene biosynthesis using Mycolicibacterium neoaurum AC-3067D. However, from a technological standpoint, residual glycerol hinders the drying of biomass, which can be used to produce feed additives for poultry and livestock. This study aims to determine the optimal concentrations of glycerol, glucose, and Tween 80 using a 2^3 full factorial experiment, along with testing an optimized medium during the deep cultivation of Mycolicibacterium neoaurum in a 3L bioreactor. We evaluated the accumulation of Mycolicibacterium neoaurum biomass and beta-carotene content in response to the replacement of 20 g/L glycerol with a combination of 10 g/L glycerol and 10 g/L glucose. The results demonstrated comparable productivity of the strain between the modified and control media, yielding 17.8 g/L biomass and 182.5 mg/kg beta-carotene. The study showed that the incorporation of Tween 80 (1 g/L) into the nutrient medium resulted in a 14.0% and 32.2% increase in biomass and beta-carotene yield, respectively, in comparison to the control. The medium, optimized using a 2^3 full factorial experiment, contained glycerol (15.0 g/L), glucose (5.0 g/L), and Tween 80 (1.5 g/L). The cultivation of Mycolicibacterium neoaurum in a bioreactor using this growth medium resulted in a maximum productivity of 376.5 mg/kg of beta-carotene and 25.2 g/L of biomass.*

Keywords: *carotenoids, Mycolicibacterium neoaurum, biosynthesis, cultivation, bioreactor*

Fundings. *The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme no. 123012000071-1).*

For citation: Yaderets V.V., Karpova N.V., Glagoleva E.V., Tsyganov V.A., Shibaeva A.S., Dzhavakhiya V.V. Optimization of culture medium for submerged cultivation of *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – a beta-carotene producing strain. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):252-261. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.981. EDN: UENDIX.

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды (от лат. carota – морковь и греч. eidos – вид) – многочисленная группа органических пигментов, синтезируемых высшими растениями, водорослями, фототрофными бактериями, мицелиальными грибами и дрожжами [1–3]. К настоящему времени известна структура 1158 каротиноидов, синтезируемых более чем 691 видом организмов [4]. Высокая биологическая активность каротиноидов и широкий спектр применения данной группы соединений [1–6] обуславливают постоянный интерес исследователей к поиску эффективных способов их получения.

В настоящее время каротиноиды, как правило, получают или путем экстракции из растительного сырья или методами химического синтеза [6, 7], однако на сегодняшний день можно отметить небезосновательную тенденцию к экологизации производства и замене химических методов на более безопасные. Известно, что альтернативой химическим способам получения являются процессы с использованием микробного синтеза. С этой точки зрения актуальным становится поиск эффективных путей производства каротиноидов с использованием микроорганизмов [8].

Согласно литературным данным, основные исследования сосредоточены на оптимизации условий культивирования гетероталлических штаммов грибов *Blakeslea trispora* [9–11] или дрожжей рода *Rhodotorula* [12, 13]. Перспективными продуцентами каротиноидов могут также являться быстрорастущие непатогенные бактерии рода *Mycolicibacterium* [14]. Ценным преимуществом использования бактерий в качестве продуцентов каротиноидов является отсутствие зависимости биосинтеза от полового цикла микроорганизма, как в случае *B. trispora* [9–11], что способно значительно упростить технологическую схему получения биологически активных соединений и сократить время биосинтеза. В связи с этим получение новых высокоэффективных продуцентов каротиноидов и разработка технологии их получения является актуальным направлением научных исследований настоящего времени.

Учитывая вышесказанное, цель представленного исследования заключалась в оптимизации источника углерода и Твин-80 в ферментационной среде для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D в биореакторе объемом 3 л.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Используемый в работе штамм получен путем химического мутагенеза с применением N-нитрозо-N-метилмочевины и направленной селекции из штамма *M. neoaurum* Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Ас-1634 [15]. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Скрябина РАН под номером VKM Ac-3067D.

Для поддержания штамма *M. neoaurum* VKM Ac-3067D использовали агаризованную среду следующего состава, г/л: агар-агар – 17,0, глюкоза – 10,0, соевая мука – 10,0, лимонная кислота – 2,2, мочевина – 0,5, NH_4Cl – 1,0, KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,5, $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,05, $CaCO_3$ – 1,5 (pH среды 6,8–7,2). Штамм поддерживали в течение 1 месяца при температуре 4 °C, затем пересевали на свежие среды. Хранили *M. neoaurum* при 4 °C в лиофилизированном состоянии, защитной средой служило сухое молоко.

Контрольная жидкая среда (среда АМ), использованная для последующей модификации, имела следующий состав, г/л: глицерин – 20,0, сухое обезжиренное молоко – 10,0, лимонная кислота – 2,2, мочевина – 1,0, NH_4Cl – 1,0, KH_2PO4 – 0,5, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,5, $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,05, $CaCO_3$ – 1,5 (pH среды 6,8–7,2). Процесс оптимизации состава питательной среды вели в качалочных колбах объемом 750 мл.

Для получения инокулята в пробирку с культурой приливали 10 мл стерильного физиологического раствора и микробиологической петлей аккуратно снимали слой клеток, который затем переносили в качалочные колбы, содержащие 100 мл среды. Колбы с культурой помещали на 48 ч в шейкер-инкубатор Innova 44R (Eppendorf SE, Германия) с орбитой движения платформы 5,1 см при 220 об/мин и 35 °C. Затем полученный инокулят в количестве 10% об. переносили в колбы с соответствующей питательно средой и выращивали в тех же условиях в течение 48–72 ч. Полученную культуральную жидкость либо использовали для засева ферментационной установки, либо же сушили для определения содержания каротиноидов.

Содержание каротиноидов в биомассе *M. neoaurum* определяли спектрофотометрически [15]. Для этого 30 мл культуральной жидкости центрифугировали при 7500 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант декантировали, а полученную биомассу экстрагировали 10 мл ацетона 3 раза. Ацетоновые экстракты объединяли, переносили в делительную воронку, добавляли 10 мл петролейного эфира, тщательно встряхивали и вносили 3–5 капель насыщенного раствора NaCl до разрушения эмульсии. Затем отделяли ацетоновый слой и вновь экстрагировали петролейным эфиром. Полученные петролейные экстракты объединяли и фильтровали через стеклянный фильтр. Спектр поглощения экстракта каротиноидов определяли на спектрофотометре Thermo Spectronic (Thermo FS, США) при длине волны 450 нм против растворителя (петролейного эфира). Суммарное содержание каротиноидов, мкг/г, определяли по следующей формуле:

$$\text{Каротиноиды} = \frac{V \times \text{A}450 \times D}{E \times W},$$

где V – объем пробы, мл; A450 – степень поглощения раствора, полученная экспериментально; D – коэффициент разбавления образца; E = 2592 – значение 1% экстинции; W – биомасса сухих клеток, г.

Для глубинного культивирования штамма использовали ферментационную установку общим объемом 3 л (ООО «Проинтех», Россия). Данный биореактор имеет встроенное компьютерное управление, позволяющее регулировать основные ферментационные параметры – pH, скорость перемешивания, температуру и pO_2. В устройства измерения параметров культуральной жидкости в процессе ферментации входят: термодатчик для измерения температуры, связанный с контроллером управления («Бук-3», Россия); датчик для измерения показателя pH (InPro3300/225/PT1000, Mettler Toledo, Швейцария), связанный через управляющий контроллер с перистальтическим насосом, подающим титрующий раствор; датчик измерения растворенного кислорода (InPro 6800/12/220, Mettler Toledo, Швейцария), связанный через управляющий контроллер с механическим перемешивающим устройством.

Питательную среду объемом 1,5 л (pH среды до стерилизации – 6,8–7,2), загружали в биореактор и вместе со средой помещали в автоклав для стерилизации (60–90 мин при 121 °C). Дополнительные жидкие компоненты (растворы глюкозы 2,5 г/л, кислот, щелочей, дистиллированной воды) стерилизовали отдельно в колбах с нижним тубусом, оснащенных соединительными шлангами и иглами. После стерилизации биореактор помещали на ферментационную установку, подключали датчики, потоки воздуха и охлаждающей воды, электродвигатель. Начальное значение содержания pO_2 в среде устанавливали на отметке 100%.

Основные параметры культивирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Режим в ферментере перед посевом

Table 1. Parameters in bioreactor before cultivation

Наименование параметра	Значение показателя
Объем среды	1,5 л
Температура	35±1 °C
Аэрация	0,1 л/мин
Скорость перемешивания среды	250 об/мин
Значение pO_2	100% от насыщения
pH среды	6,8–7,2

Регулировку уровня pO_2 осуществляли путем изменения объема подачи воздуха на объем культуральной жидкости в ручном режиме с изменением количества оборотов перемешивающего устройства в автоматическом режиме. Основные параметры культивирования штамма в 3-литровом ферментере представлены в табл. 2.

Значение pH на уровне 7,0–7,2 поддерживали путем подачи 5%-го раствора HCl при помощи перистальтического насоса в автоматическом режиме. В процессе ферментации каждые 18–22 ч отбирали аликвоту культуральной жидкости для микробиологического контроля чистоты культуры и определения количества биомассы. Продолжительность процесса составляла 72–76 ч. В случае нежелательного пенообразования уменьшали скорость перемешивания среды и вносили пеногаситель (Софэксил-1520А, стерильный 50%-й раствор).

Таблица 2. Режим в ферментере в процессе культивирования

Table 2. Parameters in bioreactor during cultivation

Параметр	Величина показателя
Температура	35±1 °C
Аэрация	0,1 л/мин
pH	7,0–7,2
Перемешивание	Для поддержания необходимого уровня растворенного кислорода (pO_2 не ниже 50%) скорость перемешивания составляет 300–400 об/мин

После окончания ферментации биомассу микалицебактерий инактивировали при температуре 80–85 °C и перемешивании в течение 30 мин. Далее биомассу сливали в приемник, центрифугировали и сушили на лиофильной сушилке (Martin Christ ALPHA 2-4LD plus, Германия).

Эксперименты проводили в 3 повторностях. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программы MS Excel 2010.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В биотехнологических процессах, основанных на использовании высокопродуктивных штаммов, основное внимание, помимо создания самого штамма, должно уделяться определению оптимальных условий культивирования [11, 16]. Оптимизация условий культивирования может осуществляться на основе сочетания экспериментального и математического моделирования.

Ранее авторами была проведена серия экспериментов по изучению влияния на накопление биомассы *M. neoaurum* и *β*-каротина таких источников углерода, как глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза, арабиноза, глицерин, маннит и сорбит, количество которых во всех вариантах составляло 20,0 г/л. Контролем служила питательная среда с глюкозой. Установлено, что наибольшее влияние на биосинтез каротиноидов клетками *M. neoaurum* оказывает глицерин. Отмечено увеличение выхода биомассы на 15,1% и содержания *β*-каротина на 14,7% по сравнению с контрольными условиями [15]. Факт стимуляции биосинтеза каротиноидов может быть объяснен тем, что, согласно данным литературы, глицерин участвует в биосинтезе изопреноидов – предшественников каротиноидов. Однако с технологической точки зрения наличие остаточного глицерина в биомассе *M. neoaurum* может сильно затруднять процесс ее сушки. В связи с этим было предложено изучить влияние на накопление биомассы и содержание в ней *β*-каротина, комбинации глицерина и глюкозы в количестве 10,0 г/л каждого компонента. В качестве контроля использовались среды с содержанием глицерина и глюкозы по 20,0 г/л. Результаты представлены на рис. 1.

Как следует из полученных данных, комбинация глицерина и глюкозы позволяет получить аналогичные результаты по выходу биомассы и содержания в ней *β*-каротина.

Согласно данным литературы, внесение в ростовую среду разнообразных по своей природе экзогенных факторов может привести к изменению метаболической

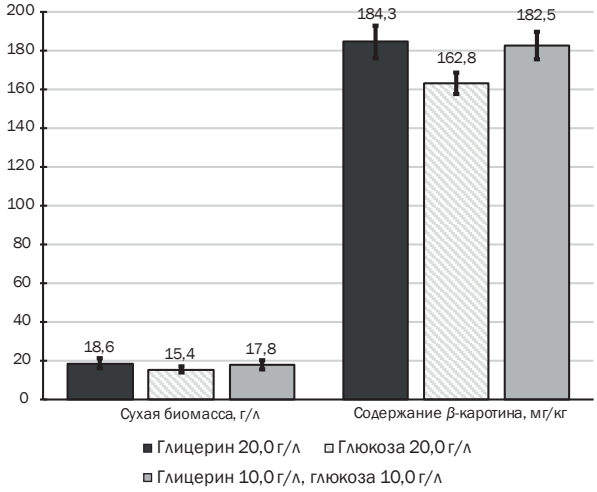

Рис. 1. Накопление биомассы *Mycolicibacterium neoaurum* и *β*-каротина в зависимости от источника углерода в ростовой среде

Fig. 1. Effect of a carbon source on the *Mycolicibacterium neoaurum* biomass accumulation and *β*-carotene production

активности клеток. Так, например, установлено воздействие поверхностно активных веществ на стероидтрансформирующую активность клеток *Mycolicibacterium* [17]. Известна серия экспериментов по увеличению биосинтеза *β*-каротина при культивировании *Phycomyces blakesleeanus* в питательной среде с включением Твин-80 [18]. Данный эффект может быть связан с двумя вещами. С одной стороны, являясь солюбилизатором, Твин-80 способствует более эффективному клеточному массообмену, стимулируя рост микроорганизмов и синтез вторичных метаболитов. С другой стороны, наличие Твин-80 также обеспечивает увеличение растворимости липофильного *β*-каротина и его предшественников, делая их более доступными для ферментных систем, вовлеченных в биосинтез пигментов. В связи с этим было интересным проверить влияние таких солюбилизаторов, как Твин-80, Спан-20 и метил-*β*-циклодекстрин (МЦД) на накопление биомассы *M. neoaurum* и содержание в ней *β*-каротина. Результаты представлены на рис. 2.

Как следует из полученных данных, отображенных на рис. 2, культивирование штамма в ростовой среде, содержащей Твин-80 (1,0 г/л), привело к увеличению выхода биомассы содержащегося в ней *β*-каротина на 14,0 и 32,2% по сравнению с контролем. При внесении в питательную среду Спан-20 (1,0 г/л) и МЦД (2,5 г/л) наблюдалось ингибирование процесса накопления биомассы *M. neoaurum* на 5,6 и 3,4% соответственно. Также отмечено снижение содержания *β*-каротина на 8,5 и 7,0% в средах, содержащих Спан-20 и МЦД по сравнению с контрольными условиями. Ингибирование роста клеток и снижение уровня биосинтеза *β*-каротина в вариантах с МЦД (2,5 г/л) и Спан-20 (1,0 г/л) совпадает с данными литературы [17]. Возможно, лимитирующим фактором являются выбранные концентрации солюбилизаторов, поэтому в будущем следует провести более детальное исследование зависимости между степенью ингибирования роста *M. neoaurum* и концентрациями МЦД и Спан-20.

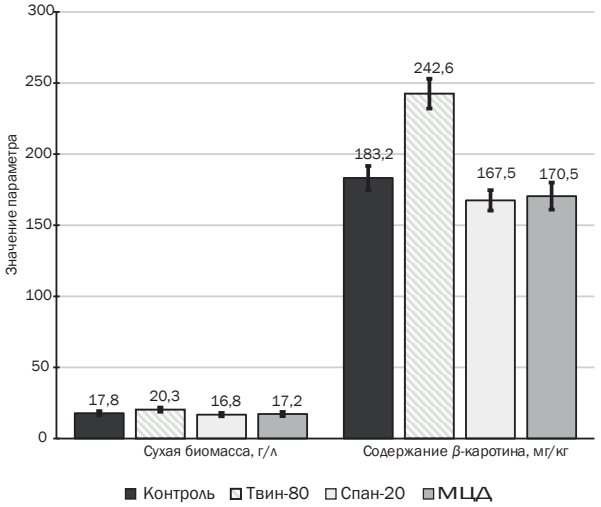

Рис. 2. Накопление биомассы *Mycolicibacterium neoaurum* и *β*-каротина при внесении в ростовую среду Твин-80 (1,0 г/л), Спан-20 (1,0 г/л) и метил-*β*-циклодекстрина (2,5 г/л)

Fig. 2. Effect of Twin-80 (1.0 g/l), Span-20 (1.0 g/l) and methyl-*β*-cyclodextrin (2.5 g/l) on the *Mycolicibacterium neoaurum* biomass accumulation and *β*-carotene production

Клетки миколицибактерий отличаются сложной структурой клеточной стенки, содержащей до 60% липидов, что обуславливает ее высокую гидрофобность и склонность клеток к агрегации в процессе роста в жидкой среде. В то же время при культивировании *M. neoaurum в* присутствии солюбилизаторов культура более однородна, а размер формируемых клеточных скоплений практически в 2–3 раза меньше при сравнении с контрольными условиями.

Оптимизация состава ростовой среды – эффективный метод увеличения биосинтетической активности микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ [19, 20]. Состав среды можно определить двумя способами: эмпирическим подбором или путем использования методов математического планирования эксперимента. Традиционный метод эмпирического подбора широко используется для определения оптимальных условий культивирования микроорганизмов [16]. Тем не менее планирование эксперимента позволяет варьировать одновременно все факторы и получать количественные оценки влияния на выход целевого показателя основных факторов и эффектов взаимодействия между ними с меньшими ошибками, чем традиционные методы однофакторного исследования. Для оценки влияния на биосинтез *β*-каротина клетками *M. neoaurum* глицерина, глюкозы и Твин-80 проведен полный факторный эксперимент. Каждый фактор исследовали на двух уровнях – нижнем (-1) и верхнем (+1) (табл. 3).

Таблица 3. Значения факторов в натуральных переменных, шага варьирования и концентрации основных компонентов ферментационных сред

Table 3. Values of factors in natural variables, units of variation and concentration of the main components of fermentation media

Фактор	x_1	x_2	x_3
Наименование фактора	Концентрация глицерина	Концентрация глюкозы	Концентрация Твин-80
Базовая концентрация параметра, г/л	10,0	10,0	1,0
Шаг варьирования, г/л	5,0	5,0	0,5
–1	5,0	5,0	0,5
+1	15,0	15,0	1,5

Количество опытов определено по формуле

$$N = n^k,$$

где n – количество уровней варьирования, k – количество факторов [16]. В данном исследовании $N = 8$. Исходя из этого построена матрица планирования эксперимента для полного факторного эксперимента типа 2^3. По построенной матрице планирования эксперимента проведена серия экспериментов, каждый опыт выполнен в 3 повторностях. Результаты представлены в табл. 4.

Коэффициенты уравнения регрессии определяли по методу наименьших квадратов[1]. Величина коэффициента

Таблица 4. Матрица планирования для полного факторного эксперимента типа 2^3

Table 4. Experiment planning matrix for 2^3 full factorial experiment

Номер опыта	Факторы в кодированном виде			Факторы в натуральном масштабе, г/л			Выход *β*-каротина, мг/кг
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	-1	5	5	0,5	152,37
2	+1	-1	-1	15	5	0,5	194,17
3	-1	+1	-1	5	15	0,5	162,00
4	+1	+1	-1	15	15	0,5	207,40
5	-1	-1	+1	5	5	1,5	164,03
6	+1	-1	+1	15	5	1,5	258,23
7	-1	+1	+1	5	15	1,5	174,77
8	+1	+1	+1	15	15	1,5	230,07

[1] Рожнов Е.Д. Моделирование биотехнологических процессов: методические рекомендации по выполнению лабораторных работ, проведению практических занятий и организации самостоятельной работы студентов направления подготовки 19.04.01: Биотехнология. Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2019. 96 с.

регрессии характеризует вклад каждого фактора (x_i) питательной среды в значение Y (концентрация β-каротина) полученного уравнения регрессии, имеющего вид $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$. Проверка значимости коэффициентов регрессии показала, что значимыми коэффициентами являются b_1 и b_3. В связи с этим полином первой степени при проведении планирования полного факторного эксперимента типа 2^3 имел вид $Y = 193{,}0 + 29{,}74x_1 + 14{,}05x_3$. Однородность и воспроизводимость эксперимента оценена по критерию Кохрена (Gp). Для полученных данных $Gp = 0{,}20$, что меньше табличного значения для используемых степеней свободы ($Gp < Gт$, $0{,}20 < 0{,}51$). Исходя из этого, сделан вывод об однородности и воспроизводимости выполненного эксперимента. Проверка адекватности по критерию Фишера[1] полинома первого порядка показала, что $F_P > F_т$ ($10{,}12 > 2{,}85$). Из этого следует, что полученное уравнение неадекватно, то есть данный процесс не может быть описан уравнением линейного приближения. Ко всему прочему, полученные результаты свидетельствует о близости процесса к околооптимальной области, когда усиливается влияние взаимодействия факторов.

В связи с вышесказанным принято решение о построении новой матрицы планирования эксперимента, учитывающей взаимное влияние факторов друг на друга, и рассчитаны коэффициенты взаимодействия (табл. 5).

Полученное уравнение регрессии имело следующий вид:

$$Y = 193{,}03 + 29{,}74x_1 + 14{,}05x_3 - 4{,}57x_1x_2 -$$

$$- 5{,}47x_2x_3 + 7{,}94x_1x_3 - 5{,}47x_1x_2x_3.$$

Рассчитанное значение критерия Фишера $F_p = 2{,}24$. Табличное значение критерия Фишера $F_т$ определяют при $f_{ад} = 1$ и $f = 16$. Поскольку $F_p < F_т$ ($2{,}19 < 4{,}49$), полученное уравнение регрессии адекватно изучаемому процессу. Таким образом, согласно данным, полученным в результате построения математической модели, и выполненным расчетам можно заключить, что на накопление β-каротина клетками *M. neoaurum* в изучаемой области концентраций положительно влияют увеличение количества глицерина и Твин-80. В то же время эффект от данных факторов усиливается от совместного действия факторов x_1, x_2 и x_3 при условии, что факторы находятся на высшем уровне координирования. По итогам эксперимента была предложена ростовая среда, содержащая глицерин (15,0 г/л), глюкозу (5,0 г/л) и Твин-80 (1,5 г/л).

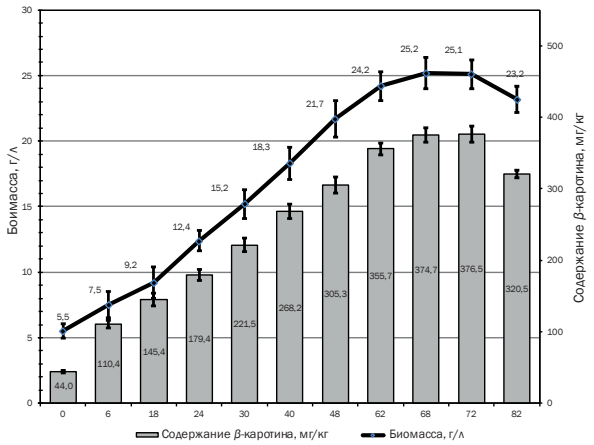

Рис. 3. Накопление биомассы и β-каротина в культуральной жидкости *Mycolicibacterium neoaurum* при культивировании в биореакторе объемом 3 л с внесением подпитки (раствор глюкозы 2,5 г/л) на 30 ч ферментации

Fig. 3. Accumulation of biomass and β-carotene during *Mycolicibacterium neoaurum* cultivation in a 3-L bioreactor with the addition of glucose solution 2.5 g/l for 30 h of fermentation

Далее представлялось интересным провести культивирование штамма в биореакторе объемом 3 л в подобранной питательной среде. Ферментацию *M. neoaurum* вели в условиях поддержания pH среды (7,0–7,2) и концентрации растворенного кислорода (50%). Твин-80 в количестве 1,5 г/л вносили до стерилизации.

Понижение концентрации быстро метаболизирующихся сахаров, включая глюкозу, может привести к нарушению биосинтеза вторичных метаболитов, в том числе β-каротина. В периодических процессах данная проблема может быть решена путем периодической подачи лимитирующего субстрата, что позволяет избежать репрессивного эффекта начальной высокой концентрации субстрата и увеличить выход целевого метаболита. В связи с этим после 30 ч ферментации было обеспечено одноразовое добавление стерильного раствора глюкозы

Таблица 5. План опыта и результаты, полученные при его реализации

Table 5. Experimental design and the results obtained during its implementation

Номер опыта	Факторы в натуральном масштабе, г/л			Факторы в кодированном виде			Вспомогательные графы в матрице полного факторного эксперимента типа 2^3				Выход β-каротина, мг/л
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_2x_3	x_1x_3	$x_1x_2x_3$	$\bar{y}_u$
1	5	5	0,50	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	152,37
2	15	5	0,50	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+	194,17
3	5	15	0,50	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	162,00
4	15	15	0,50	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	207,40
5	5	5	1,50	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+	164,03
6	15	5	1,50	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	258,23
7	5	15	1,50	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	174,77
8	15	15	1,50	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	230,07

(2,5 г/л) в объеме 100 мл при контролируемых оптимальных значениях pH и концентрации pO_2 (7,0–7,2 и 50% соответственно). Добавление глюкозы начиналось в автоматическом режиме, когда значение pH превышало 7,0, а значение растворенного кислорода уменьшалось. Результаты представлены на рис. 3. Продуктивность *M. neoaurum* по *β*-каротину и максимальный прирост биомассы были отмечены на 68–72 ч культивирования и составили 376,5 мг/кг и 25,2 г/л соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с полученными данными могут быть сделаны следующие выводы:

1. Согласно проведенным исследованиям и построенным уравнениям регрессии установлено, что наибольшее влияние на биосинтез *β*-каротина клетками *M. neoaurum* оказывают такие факторы, как концентрация глицерина и Твин-80.

2. С использованием метода математического планирования определены концентрации глицерина, глюкозы и Твин-80, составившие 15,0, 5,0 и 1,5 г/л соответственно. При культивировании *M. neoaurum* в колбах в подобранных условиях продуктивность штамма по *β*-каротину составила 258,23 мг/кг.

3. При культивировании *M. neoaurum* в биореакторе объемом 3 л с использованием питательной среды разработанного состава и внесением на 30 ч культивирования подпитки в виде 100 мл раствора глюкозы (2,5 г/л) выход *β*-каротина составил 376,5 мг/кг, биомассы – 25,2 г/л.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pagels F., Vasconcelos V., Guedes A.C. Carotenoids from cyanobacteria: biotechnological potential and optimization strategies // Biomolecules. 2021. Vol. 11, no. 5. P. 735. DOI: 10.3390/biom11050735.

2. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments // Journal of Natural Medicines. 2020. Vol. 74. P. 1–16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x.

3. Ashokkumar V., Flora G., Sevanan M., Sripriya R., Chen W.H., Park J.-H., et al. Technological advances in the production of carotenoids and their applications – a critical review // Bioresource Technology. 2023. Vol. 367. P. 128215. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128215.

4. Foong L.C., Loh C.W.L., Ng H.S., Lan J.C.-W. Recent development in the production strategies of microbial carotenoids // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 37. P. 12. DOI: 10.1007/s11274-020-02967-3.

5. Novoveská L., Ross M.E., Stanley M.S., Pradelles R., Wasiolek V., Sassi J.-F. Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction // Marine Drugs. 2019. Vol. 17, no. 11. P. 640. DOI: 10.3390/md17110640.

6. Jing Y., Wang Y., Zhou D., Wang J., Li J., Sun J., et al. Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including *β*-carotene, lycopene and astaxanthin // Biotechnology Advances. 2022. Vol. 61. P. 108033. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108033.

7. Naz T., Ullah S., Nazir Y., Li S., Iqbal B., Liu Q., et al. Industrially important fungal carotenoids: advancements in biotechnological production and extraction // Journal of Fungi. 2023. Vol. 9, no. 5. P. 578. DOI: 10.3390/jof9050578.

8. Silva Igreja W., de Andrade Maia F., Santos Lopes A., Campos Chisté R. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, no. 16. P. 8819. DOI: 10.3390/ijms22168819.

9. Luo W., Gong Z., Li N., Zhao Y., Zhang H., Yang X., et al. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* // Applied and Environmental Microbiology. 2020. Vol. 86, no. 6. P. e02462–e024619. DOI: 10.1128/AEM.02462-19.

10. Roukas T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation // Critical Reviews in Biotechnology. 2016. Vol. 36, no. 3. P. 424–433. DOI: 10.3109/07388551.2014.989424.

11. Shariati S., Zare D., Mirdamadi S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora* // Food Science and Biotechnology. 2019. Vol. 28. P. 469–479. DOI: 10.1007/s10068-018-0484-0.

12. Gong G., Liu L., Zhang X., Tan T. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription // Bioresource Technology. 2019. Vol. 288. P. 121559. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121559.

13. Kot A.M., Błażejak S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // Applied Microbiology and Biotechnology. 2016. Vol. 100. P. 6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.

14. Tran T., Dawrs S.N., Norton G.J., Virdi R., Honda J.R. Brought to you courtesy of the red, white, and blue-pigments of nontuberculous mycobacteria // AIMS Microbiology. 2020. Vol. 6, no. 4. P. 434–450. DOI: 10.3934/microbiol.2020026.

15. Yaderets V.V., Karpova N., Glagoleva E.V., Shibaeva A., Dzhavakhiya V. Enhanced *β*-carotene production in *Mycolicibacterium neoaurum* Ac-501/22 by combining mutagenesis, strain selection, and subsequent fermentation optimization // Fermentation. 2023. Vol. 9, no. 12. P. 1007. DOI: 10.3390/fermentation9121007.

16. Попова Е.Д., Глаголев В.И., Савушкин В.А., Овчинников А.И., Савельева В.В., Джавахия В.В. [и др.]. Оптимизация ферментационной среды для культивирования штамма *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D – продуцента антибиотика эремомицина // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. N 1-2. С. 16–21. DOI: 10.23670/IRJ.2017.55.008. EDN: XRHEUX.

17. Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl-*β*-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria // Microbiology. 2007. Vol. 153, no. 6. P. 1981–1992. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001636-0.

18. Murillo F.J., Torres-Martinez S., Aragon C.M.G., Cerda-Olmedo E. Substrate transfer in carotene biosynthesis in phycomyces // European Journal of Biochemistry. 1981. Vol. 119, no. 3. P. 511–516. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05637.x.

19. Dyaa A., Soliman H., Abdelrazak A., Samra B.N., Khojah E., Ahmed A.F., et al. Optimization of carotenoids production from *Rhodotorula* sp. strain ATL72 for enhancing its biotechnological applications // Journal of Fungi. 2022.

Vol. 8, no 2. P. 160. DOI: 10.3390/jof8020160.

20. Ekpenyong M., Asitok A., Antigha R., Ogarekpe N., Ekong U., Asuquo M., et al. Bioprocess optimization of nutritional parameters for enhanced anti-leukemic l-asparaginase production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: a sequential statistical approach // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2021. Vol. 27. P. 1501–1527. DOI: 10.1007/s10989-021-10188-x.

REFERENCES

1. Pagels F., Vasconcelos V., Guedes A.C. Carotenoids from cyanobacteria: biotechnological potential and optimization strategies. *Biomolecules*. 2021;11(5):735. DOI: 10.3390/biom11050735.

2. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 2020;74:1-16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x.

3. Ashokkumar V., Flora G., Sevanan M., Sripriya R., Chen W.H., Park J.-H., et al. Technological advances in the production of carotenoids and their applications – a critical review. *Bioresource Technology*. 2023;367:128215. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128215.

4. Foong L.C., Loh C.W.L., Ng H.S., Lan J.C.-W. Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021;37:12. DOI: 10.1007/s11274-020-02967-3.

5. Novoveská L., Ross M.E., Stanley M.S., Pradelles R., Wasiolek V., Sassi J.-F. Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*. 2019;17(11):640. DOI: 10.3390/md17110640.

6. Jing Y., Wang Y., Zhou D., Wang J., Li J., Sun J., et al. Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including *β*-carotene, lycopene and astaxanthin. *Biotechnology Advances*. 2022;61:108033. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108033.

7. Naz T., Ullah S., Nazir Y., Li S., Iqbal B., Liu Q., et al. Industrially important fungal carotenoids: advancements in biotechnological production and extraction. *Journal of Fungi*. 2023;9(5):578. DOI: 10.3390/jof9050578.

8. Silva Igreja W., de Andrade Maia F., Santos Lopes A., Campos Chisté R. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):8819. DOI: 10.3390/ijms22168819.

9. Luo W., Gong Z., Li N., Zhao Y., Zhang H., Yang X., et al. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(6):e02462-e024619. DOI: 10.1128/AEM.02462-19.

10. Roukas T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3):424-433. DOI: 10.3109/07388551.2014.989424.

11. Shariati S., Zare D., Mirdamadi S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora*. *Food Science and Biotechnology*. 2019;28:469-479. DOI: 10.1007/s10068-018-0484-0.

12. Gong G., Liu L., Zhang X., Tan T. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription. *Bioresource Technology*. 2019;288:121559. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121559.

13. Kot A.M., Błażejak S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100:6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.

14. Tran T., Dawrs S.N., Norton G.J., Virdi R., Honda J.R. Brought to you courtesy of the red, white, and blue-pigments of nontuberculous mycobacteria. *AIMS Microbiology*. 2020;6(4):434-450. DOI: 10.3934/microbiol.2020026.

15. Yaderets V.V., Karpova N., Glagoleva E.V., Shibaeva A., Dzhavakhiya V. Enhanced *β*-carotene production in *Mycolicibacterium neoaurum* Ac-501/22 by combining mutagenesis, strain selection, and subsequent fermentation optimization. *Fermentation*. 2023;9(12):1007. DOI: 10.3390/fermentation9121007.

16. Popova E.D., Glagolev V.I., Savushkin V.A., Ovchinnikov A.I., Saveleva V.V., Dzhavakhiya V.V., et al. Optimization of fermentation medium for the cultivation of *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D, a producer of the antibiotics eremomycin. *International Research Journal*. 2017;1-2:16-21. (In Russian). DOI: 10.23670/IRJ.2017.55.008. EDN: XRHEUX.

17. Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl-*β*-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria. *Microbiology*. 2007;153(6):1981-1992. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001636-0.

18. Murillo F.J., Torres-Martinez S., Aragon C.M.G., Cerda-Olmedo E. Substrate transfer in carotene biosynthesis in phycomyces. *European Journal of Biochemistry*. 1981;119(3):511-516. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05637.x.

19. Dyaa A., Soliman H., Abdelrazak A., Samra B.N., Khojah E., Ahmed A.F., et al. Optimization of carotenoids production from *Rhodotorula* sp. strain ATL72 for enhancing its biotechnological applications. *Journal of Fungi*. 2022;8(2):160. DOI: 10.3390/jof8020160.

20. Ekpenyong M., Asitok A., Antigha R., Ogarekpe N., Ekong U., Asuquo M., et al. Bioprocess optimization of nutritional parameters for enhanced anti-leukemic l-asparaginase production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: a sequential statistical approach. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2021;27:1501-1527. DOI: 10.1007/s10989-021-10188-x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ядерец Вера Владимировна,
к.б.н., заведующий лабораторией,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
✉ verayaderetz@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-5220-7877

Карпова Наталья Викторовна,
к.б.н., научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
ashatanr@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6652-4136

Глаголева Елена Викторовна,
научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
glagolevaev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3894-0255

Цыганов Владимир Алексеевич,
младший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
ts_wladimir@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-3658-519X

Шибаева Александра Сергеевна,
младший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
aleksandrashibaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-1115-6532

Джавахия Вахтанг Витальевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
vahoru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5161-5051

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vera V. Yaderets,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
✉ verayaderetz@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-5220-7877

Natalya V. Karpova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
ashatanr@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6652-4136

Elena V. Glagoleva,
Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
glagolevaev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3894-0255

Vladimir A. Tsyganov,
Junior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
ts_wladimir@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-3658-519X

Alexandra S. Shibaeva,
Junior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
aleksandrashibaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-1115-6532

Vahtang V. Dzhavakhiya,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
vahoru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5161-5051

Вклад авторов

В.В. Ядерец – разработка концепции, разработка методологии, административное руководство исследовательским проектом, редактирование рукописи.
Н.В. Карпова – разработка методологии, проведение исследования, написание черновика рукописи.
Е.В. Глаголева – научное руководство, курирование данных.
В.А. Цыганов – проведение исследования, валидация результатов.
А.С. Шибаева – проведение исследования, визуализация.
В.В. Джавахия – формальны анализ, редактирование рукописи, предоставление ресурсов.

Contribution of the authors

Vera V. Yaderets – conceptualization, methodology, project administration, editing.
Natalya V. Karpova – methodology, investigation, writing – original draft.
Elena V. Glagoleva – supervision, data curation.
Vladimir A. Tsyganov – investigation, validation.
Alexandra S. Shibaeva – investigation, visualization.
Vahtang V. Dzhavakhiya – formal analysis, editing, resources.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Информация о статье

Поступила в редакцию 18.07.2024.
Одобрена после рецензирования 11.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 18.07.2024.
Approved after reviewing 11.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.