

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СКРИНИНГА ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ШТАММОВ *MORTIERELLA ALPINA* PEYRONEL

Г. В. Ильина¹, Д. Ю. Ильин², А. Р. Дашкина³, И. А. Кузнецов⁴

^{1,2,3,4} Пензенский государственный аграрный университет, г. Пенза, Россия

¹ilyina.g.v@pgau.ru, ²ilyin.d.u@pgau.ru, ³dashkina.a.r@pgau.ru, ⁴kuznetsov.igor28@yandex.ru

Аннотация. Актуальность и цели. В современный период в связи с возросшей экологической нагрузкой и ситуацией экономического кризиса значительное внимание исследователей в области биотехнологии обращено к природным источникам ценных веществ, позволяющих решить проблему их дефицита относительно недорого, безопасным и экологичным путем, основанным на принципах и логике живого организма – продуцента. Представители трибы мортиерелловых грибов – грибы вида *Mortierella alpina* – обладают способностью к синтезу арахидоновой кислоты, которая может служить основой для получения продуктов, способствующих формированию иммунитета животных и ростовых процессов растений. С практических позиций важным является известный факт зависимости структуры жирнокислотного профиля мицелия от температуры окружающей среды, в связи с чем температурный фактор рассматривается как один из лимитирующих реализацию продуктивного потенциала организма. Цель исследований: разработка приемов скрининга продуктивных штаммов *M. alpina* с расширенным диапазоном толерантности к колебаниям температуры среды. В ходе работы решались следующие задачи: исследование продуктивных свойств мортиерелловых грибов, имеющихся в коллекции, и отбор наиболее перспективных штаммов; исследование возможностей повышения фенотипического разнообразия штаммов путем индуцированного мутагенеза и селекции; исследование спектра толерантности к расширению температурного диапазона культивирования с сохранением продуктивных свойств штаммов. **Результаты.** Проведенные исследования позволили установить особенности воздействия температуры среды культивирования на структуру жирнокислотного профиля изученных штаммов. Реализация приемов индуцированного мутагенеза позволила получить серию фенотипических классов мутантов, которые были подвергнуты всестороннему изучению. Оценена толерантность полученных штаммов к моделируемому диапазону температур, вслед за чем осуществлен скрининг культур с наиболее стабильным жирнокислотным профилем, отвечающим практическим интересам. Проведено исследование клеточных механизмов термотолерантности отобранных штаммов. **Выводы.** Вариабельность мутантных штаммов *M. alpina* определяет формирование материала для скрининга термотолерантных продуктивных штаммов. Причем сохранение у термотолерантных штаммов указанной экологической характеристики в ряду поколений может служить маркером стабильности и продуктивных характеристик.

Ключевые слова: температурный фактор, жирные кислоты, экологическая валентность, мутагенез, скрининг, арахидоновая кислота

Для цитирования: Ильина Г. В., Ильин Д. Ю., Дашкина А. Р., Кузнецов И. А. Экологические аспекты скрининга термотолерантных штаммов *Mortierella alpina* peyronel // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2023. Vol. 8 (1). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-1-3>

ENVIRONMENTAL ASPECTS OF SCREENING FOR THERMOTOLERANT STRAINS *MORTIERELLA ALPINA* PEYRONEL

G. V. Ilyina¹, D. Yu. Ilyin², A. R. Dashkina³, I. A. Kuznetsov⁴

^{1,2,3,4} Penza State Agrarian University, Penza, Russia

¹ilyina.g.v@pgau.ru, ²ilyin.d.u@pgau.ru, ³dashkina.a.r@pgau.ru, ⁴kuznetsov.igor28@yandex.ru

Abstract. *Background.* In the modern period, due to the increased environmental burden and the situation of the economic crisis, considerable attention of researchers in the field of biotechnology is drawn to natural sources of valuable substances that allow solving the problem of their deficiency in a relatively inexpensive, safe and environmentally friendly way, based on the principles and logic of a living organism – producer. Representatives of the tribe of *Mortierella* mushrooms – fungi of the species *Mortierella alpina* have the ability to synthesize arachidonic acid, metabolites can serve as the basis for obtaining products that promote the formation of animal immunity and plant growth processes. From a practical point of view, the well-known fact that the structure of the fatty acid

profile of mycelium depends on the ambient temperature is important, and therefore the temperature factor is considered as one of the limiting realizations of the productive potential of the body. The purpose of the research: development of screening techniques for productive strains of *M. alpina* with an extended range of tolerance to fluctuations in environmental temperature. In the course of the research, the following tasks were solved: the study of the productive properties of *Mortierella* fungi present in the collection and the selection of the most promising strains; study of the possibilities of increasing the phenotypic diversity of strains by induced mutagenesis and selection; study of the spectrum of tolerance to the expansion of the temperature range of cultivation while maintaining the productive properties of strains. **Results.** The conducted studies made it possible to establish the features of the effect of the temperature of the cultivation medium on the structure of the fatty acid profile of the studied strains. The implementation of induced mutagenesis techniques made it possible to obtain a series of phenotypic classes of mutants, which were subjected to a comprehensive study. The tolerance of the obtained strains to the simulated temperature range was assessed, followed by screening of cultures with the most stable fatty acid profile that meets practical interests. The study of cellular mechanisms of thermotolerance of selected strains was carried out. **Conclusions.** The variability of *M. alpina* mutant strains determines the formation of material for screening thermotolerant productive strains. Moreover, the preservation of this ecological characteristic in thermotolerant strains in a number of generations can serve as a marker of stability and productive characteristics.

Keywords: temperature factor, fatty acids, ecological valency, mutagenesis, screening, arachidonic acid

For citation: Ilyina G.V., Ilyin D.Yu., Dashkina A.R., Kuznetsov I.A. Environmental aspects of screening for thermotolerant strains *Mortierella alpina* peyronel. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2022;8(1). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-1-3>

Введение

В современный период в связи с возросшей экологической нагрузкой и ситуацией экономического кризиса значительное внимание исследователей в области биотехнологии обращено к природным источникам ценных веществ, позволяющих решить проблему их дефицита относительно недорого, безопасным и экологичным путем, основанным на принципах и логике живого организма – продуцента. Представители трибы мортиерелловых грибов – грибы вида *Mortierella alpina* – обладают способностью к синтезу арахидоновой кислоты, которая может служить основой для получения продуктов, способствующих формированию иммунитета животных и ростовых процессов растений [1–3]. С практических позиций важным является известный факт зависимости структуры жирнокислотного профиля мицелия от температуры окружающей среды, в связи с чем температурный фактор рассматривается как один из лимитирующих реализацию продуктивного потенциала организма [4–6].

Цель исследований: разработка приемов скрининга продуктивных штаммов *M. alpina* с расширенным диапазоном толерантности к колебаниям температуры среды. В ходе настоящей работы решались следующие задачи: исследование продуктивных свойств мортиерелловых грибов, имеющих в коллекции, и отбор наиболее перспективных штаммов; исследование возможностей повышения фенотипического разнообразия штаммов путем индуцированного мутагенеза и селекции; исследование

спектра толерантности к расширению температурного диапазона культивирования с сохранением продуктивных свойств штаммов.

Методы исследований

Перед проведением исследований было осуществлено изучение особенностей развития и продуктивных характеристик выделенных самостоятельно из почв грибов рода *Mortierella*. Культуры, ставшие объектами исследований, были выделены из почв, расположенных на территории Пензенской области в период времени с 2016 по 2020 г. и сохраняются в коллекции микробных культур кафедры «Биология, биологические технологии и ветеринарно-санитарная экспертиза» Пензенского государственного аграрного университета.

Для уточнения родовой и видовой принадлежности культур грибов пользовались определителями Литвинова, Мирчинк и Stalpers [7–9]. Выделение, культивирование, оценку ростовых параметров мицелиальных культур, а также их хранение осуществляли в соответствии с общепринятыми в практической микологии методиками. Для дальнейших исследований были отобраны две культуры вида *Mortierella alpina*.

В качестве индукторов мутагенеза использовали бромистый этидий (cas: 1239-45-8), метилметансульфонат (cas: 66-27-3). Водными растворами указанных веществ (в концентрации 0,001 %) обрабатывали споры и фрагменты мицелия, время экспозиции – 120 мин. Использовали также УФ-излучение с длиной волны

254 нм (бактерицидная лампа T8 UGL-S02A-15W/UVCB WHITE Uniel).

Для изучения жирнокислотного профиля мицелия наращивание достаточного количества биомассы проводили в условиях микробиологической качалки, а затем высушивали материал до постоянной массы. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча с модификациями [10]. Для экстракции липидов использовали следующие системы растворителей: система А – хлороформ-этанол (1:2); система В – хлороформ-этанол (2:1). Содержание реакционно-способных для трансэтерификации жирных кислот в массе субстрата, обросшего мицелием, определяли хроматографически на хроматографе «Кристалл-5000.1» с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный капиллярной колонкой CR-WAXms, длина – 30 м, диаметр – 0,32 мм, толщина неподвижной фазы – 0,5 мкм [11]. При отборе мутантных штаммов по липидогенной активности критерием служило значение суммарного содержания жирных кислот, а также доля арахидоновой кислоты в жирнокислотном профиле при культивировании в условиях как оптимальных температур, так и при температурных колебаниях.

Все эксперименты проводились в трехкратной повторности. Статистическая обработка проводилась с помощью программы для обработки и анализа данных «Statistica 6.0». Оценка

достоверности влияния на продуктивные параметры со стороны различных факторов осуществлялась с помощью дисперсионного анализа полученного массива данных (ANOVA). Для оценки значимости полученных данных использовался t-критерий Стьюдента при уровне значимости 0,95 [12].

Результаты исследований

На первом этапе исследований были изучены культурально-морфологические и продуктивные свойства культур, а полученные результаты были сопоставлены с известными из литературных источников характеристиками [4]. Наши исследования показали, что указанные штаммы обладают специфическими для представителей рода культурально-морфологическими свойствами.

Скорость роста отобранных для исследований «родительских» штаммов № 1 и № 2 составляет соответственно 3,43 мм/сут и 8,1 мм/сут, для штамма № 2 характерен развитый воздушный мицелий белого цвета. При изучении культурально-морфологических свойств штаммов вида *M. alpina* обнаружены существенные визуальные отличия. Различались тип мицелия, его структура и степень пигментации (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид вегетативного мицелия исходных штаммов *Mortierella alpina*: слева – штамм № 1, справа – штамм № 2

Fig. 1. Appearance of the vegetative mycelium of the original strains of *Mortierella alpina*: on the left – strain no. 1, on the right – strain no. 2

Мицелий обоих штаммов устойчив к внешним воздействиям, в условиях холодильника не проявляет признаков деградации в течение 9–12 месяцев хранения. Штамм № 1 является медленнорастущим, но характеризуется максимальной плотностью мицелия. Штамм № 2 (быстрорастущий) характеризуется развитым воздушным мицелием белого цвета, который быстро стареет с признаками деградации и вы-

раженной экссудацией. Изученные штаммы рода *Mortierella* культивировали в глубинных условиях с целью наращивания достаточных для анализа объемов вегетативной биомассы мицелия. Культивирование глубинного мицелия осуществлялось при постоянном перемешивании в условиях микробиологической качалки при температуре от 25 до 30 °С. Если *M. alpina*, признанный продуцент арахидоновой

кислоты (АРК), культивируется при температуре равной и ниже 18 °С, она начинает вырабатывать эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК) [13]. Это полиненасыщенная жирная кислота (ПНЖК) класса омега-3, относящаяся к незаменимым жирным кислотам. Однако известны существенные преимущества арахидоновой кислоты перед эйкозапентаеновой в спектре ее биологической активности [14]. Таким образом, при культивировании продуцента с целью получения целевого продукта необходимо увеличивать температуру до значений, вызывающих предпочтительно продукцию АРК. Для оценки влияния температуры культивирования на жирнокислотный профиль мицелия биомасса выращивалась в условиях погруженной культуры при температурах среды $28,0 \pm 1,0$ °С

(контроль), $18,0 \pm 1,0$ °С (вариант 1); $32,0 \pm 1,0$ °С (вариант 2).

Глубинную биомассу «родительских» штаммов отфильтровывали, высушивали под вакуумом до постоянной массы и подвергали экстракции. Содержание реакционноспособных для трансэтерификации жирных кислот в массе субстрата определяли хроматографически на хроматографе «Кристалл-5000.1» с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный капиллярной колонкой CR-WAXms, длина – 30 м, диаметр – 0,32 мм, толщина неподвижной фазы – 0,5 мкм. При изучении полученных спектров жирнокислотного состава мицелиальной биомассы мицелия штаммов № 1 и № 2 *M. alpina* были идентифицированы следующие жирные кислоты (табл. 1).

Таблица 1

Жирнокислотный состав мицелия штаммов *Mortierella alpina* в зависимости от температуры культивирования (повторность трехкратная, $p < 0,05$, мг/г липидного экстракта)

Table 1

Fatty acid composition of the mycelium of *Mortierella alpina* strains depending on the cultivation temperature (threefold repetition, $p < 0.05$, mg/g of lipid extract)

Жирные кислоты	Штамм № 1 <i>M. alpina</i>			Штамм № 2 <i>M. alpina</i>		
	Температура культивирования, °С					
	28,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0	28,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0
С 14:0 (миристиновая)	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,01
С 16:0 (пальмитиновая)	0,86 ± 0,12	0,54 ± 0,09	0,99 ± 0,33	0,74 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,86 ± 0,03
С 16:1 (пальмитолеиновая)	0,38 ± 0,1	0,33 ± 0,09	0,41 ± 0,11	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01
С 18:0 (стеариновая)	0,61 ± 0,13	0,28 ± 0,06	1,31 ± 0,66	0,042 ± 0,001	–*	0,12 ± 0,03
С 18:1 (олеиновая)	102,0 ± 3,13	116,0 ± 3,43	74,6 ± 1,77	79,0 ± 1,14	86,5 ± 1,33	73,6 ± 1,33
С 18:2 (линолевая)	0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,09 ± 0,01
С 18:3 (альфа-линоленовая)	0,36 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,06 ± 0,003	0,12 ± 0,07	–*
С 20:4 (арахидоновая)	122,0 ± 3,11	92,0 ± 1,33	77,7 ± 1,33	48,2 ± 2,19	56,0 ± 1,77	33,3 ± 1,33
С 20:5 (эйкозапентаеновая)	64,3 ± 1,16	113,8 ± 2,66	36,8 ± 1,11	21,4 ± 0,66	93,3 ± 0,77	21,4 ± 0,66
С 24:0 (лигноцериновая)	0,011 ± 0,007	–*	0,04 ± 0,001	0,016 ± 0,001	–*	0,08 ± 0,001
Высококипящие компоненты	≥ 0,60	≥ 0,45	≥ 0,65	≥ 0,75	≥ 0,35	≥ 0,75

Примечание. * ниже границы обнаружения.

Как видно из таблицы, наибольшие различия в жирнокислотном составе изученных штаммов обнаруживаются для целого ряда жирных кислот, а наиболее существенные – для арахидоновой кислоты. Следует отметить, что во всех образцах содержится заметное количество высококипящих компонентов, по всей видимости, не являющихся высшими жирными кислотами. В образцах штамма № 1 *M. alpina* при температуре культивирования, оптимальной для синтеза этого метаболита, обнаружено значительное содержание арахидоновой кислоты на уровне 122,0 мг/г сухого вещества, в образцах штамма № 2 – 48,2 мг/г сухого вещества. Таким образом, установлено, что продуктивность штаммов

различна, наиболее перспективным продуцентом представляется штамм № 1 *M. alpina*. В эксперименте установлено, что существенное влияние на особенности жирнокислотного профиля мицелия оказывает температура культивирования. Общей закономерностью для обоих изученных штаммов является рост пула ненасыщенных жирных кислот при понижении температуры культивирования до $18,0 \pm 1,0$ °С, при этом пропорции АРК и ЭПК изменяются в пользу последней. При повышении температуры культивирования, напротив, растет доля насыщенных жирных кислот, содержание же целевого метаболита, как и прочих ПНЖК, снижается, причем особенно заметно для ЭПК.

Таким образом, синтез целевого продукта имеет выраженную зависимость от температуры культивирования и ее отклонения существенно влияют на процессы ее метаболизма.

Селекционная работа, осуществляемая в отношении микроорганизма-продуцента, как и любого другого биологического объекта, проводится с целью улучшения его продуктивных свойств и направлена на преобразование его генетической программы [15–17]. Наиболее распространенными и используемыми подходами в селекции микроорганизмов рассматриваются гибридизация, мутагенез и трансгенез. Для получения необходимого материала для селекции и осуществления скрининга продуктивных штаммов нами были использованы приемы индуцированного мутагенеза. Основным действующим мутагенным фактором в данном случае представлен химическими агентами, но для получения максимального эффекта прибегали дополнительно к воздействию физических факторов, используя первые и вторые в ком-

плексе [18]. В качестве исходных (родительских) культур были использованы штаммы № 1 и № 2 *M. alpina*. На первом этапе вегетативный мицелий родительских штаммов при помощи стеклянных шариков на шейкере дробился в стерильном физиологическом растворе до отдельных клеток. Клеточная суспензия наносилась на дно чашек Петри в стерильных условиях тонким слоем и экспонировалась необходимый период времени под облучателем (бактерицидная лампа T8 UGL-S02A-15W/UVCB WHITE Uniel, обеспечивающая УФ-излучение с длиной волны 254 нм); затем споры и фрагменты мицелия обрабатывались водными растворами химических мутагенов (бромистый этидий (cas: 1239-45-8), метилметансульфонат (cas: 66-27-3) в концентрации 0,001 %, время экспозиции – 120 мин. После соответствующего воздействия осуществляли рассев клеток на питательные среды для получения мутантных штаммов (рис. 2).

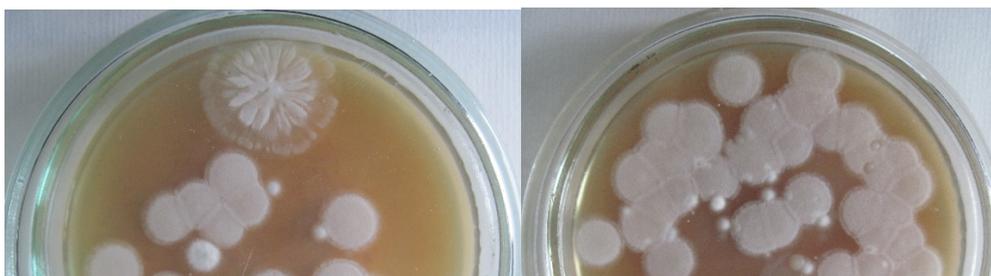


Рис. 2. Разнообразие макроморфологических особенностей колоний штаммов *M. alpina*, полученных путем индуцированного мутагенеза (слева – производные штамма № 1, справа – производные штамма № 2)

Fig. 2. Diversity of macromorphological features of colonies of *M. alpina* strains obtained by induced mutagenesis (on the left – derivatives of strain No. 1, on the right – derivatives of strain No. 2)

С использованием такого подхода была достигнута необходимая для ведения селекционной работы гетерогенность мутантных штаммов. Масса гетерогенных штаммов служит источником для проведения отбора наиболее продуктивных форм, обладающих, в совокупности, более широким спектром экологической валентности по сравнению с «родительскими» штаммами. Вместе с этим необходимо учитывать, что в живых клетках действуют разнообразные репарационные механизмы, поэтому устойчивые генетические изменения формируются не всегда. При этом значительные дозы мутагенных факторов зачастую являются летальными для клеток, оказавшихся под их воздействием. В связи с этим первостепенное значение имеет подбор оптимальных доз мутагенных факторов. Такая цель может быть достигнута изучением соотношений между долей выживших клеток и количеством полученных

фенотипических классов. В нашей работе эта величина для обоих веществ находилась на уровне 0,001 %. Для установления оптимальных концентраций мутагенов изучено воздействие концентраций бромистого этидия и метилметансульфоната от $1,0 \times 10^{-5}$ до $1,0 \times 10^{-1}$ % от массы среды. Полученные результаты приведены на рис. 3, 4.

Использование данного метода позволило определить оптимальную концентрацию химических мутагенов, которая приводит к формированию значительной гетерогенности мутантов и не вызывает их гибели. Такая концентрация установлена на уровне $1,0 \times 10^{-4}$ % от массы среды для метилметансульфоната и $1,0 \times 10^{-3}$ % от массы среды для бромистого этидия. После получения гетерогенного набора мутантных изолятов и фиксации их в чистой культуре проводили оценку их продуктивности. На первом плане при оценке перспективности штамма ле-

жит исследование жирнокислотного профиля мицелия, но при этом немаловажными характеристиками являются ростовые параметры (тем-

пы развития вегетативного мицелия), а в нашем случае и размер диапазона толерантности к колебаниям температуры культивирования.

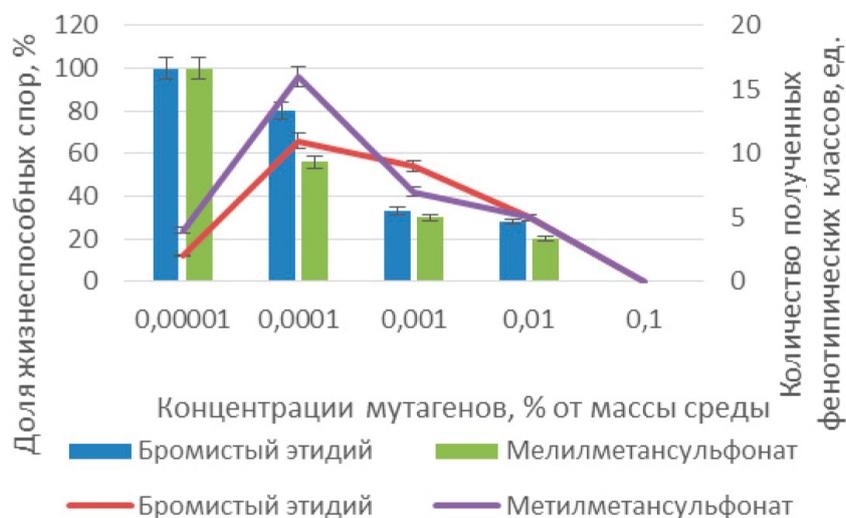


Рис. 3. Эффект использования химических мутагенов на фенотипическую диссоциацию изолятов родительского штамма № 1 *M. alpine*: столбцы – количество полученных фенотипических классов; линии графика – доля жизнеспособных спор в мутантном поколении (повторность трехкратная, $p < 0,05$, планки погрешностей – ошибка средней)

Fig. 3. Effect of the use of chemical mutagens on the phenotypic dissociation of *M. alpine* parental strain no. 1 isolates: the columns show the number of obtained phenotypic classes; the graph lines – the proportion of viable spores in the mutant generation (threefold repetition, $p < 0.05$, error bars – mean error)

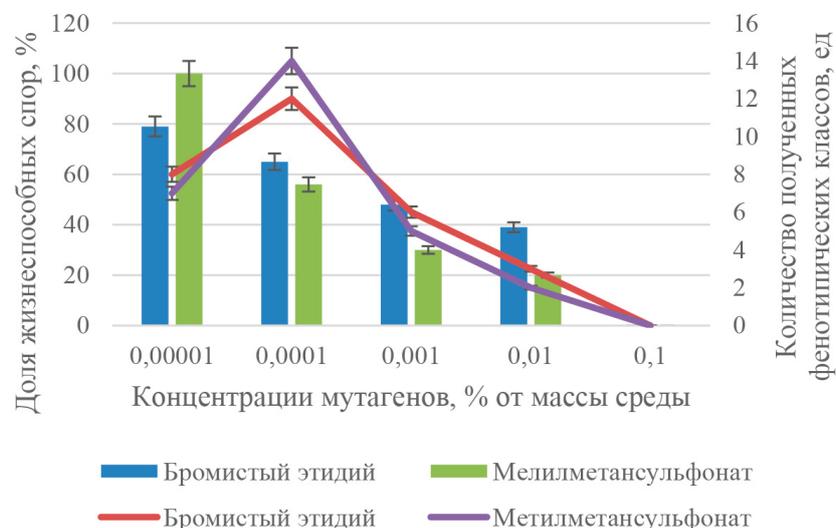


Рис. 4. Эффект использования химических мутагенов на фенотипическую диссоциацию изолятов родительского штамма № 2 *M. alpine*: столбцы – количество полученных фенотипических классов; линии графика – доля жизнеспособных спор в мутантном поколении (повторность трехкратная, $p < 0,05$, планки погрешностей – ошибка средней)

Fig. 4. Effect of the use of chemical mutagens on the phenotypic dissociation of *M. alpine* parental strain no. 2 isolates: the columns show the number of obtained phenotypic classes; the graph lines – the proportion of viable spores in the mutant generation (threefold repetition, $p < 0.05$, error bars – mean error)

В ходе изучения особенностей мутантных штаммов *M. alpine* обнаружено, что потенциал родительского штамма № 1 в плане получения

серии продуктивных мутантов оказался выше, чем таковой у штамма № 2. Сам по себе штамм № 1 обладал наиболее значительным продук-

тивным потенциалом в отношении арахидоно-вой кислоты и пониженными, по сравнению со штаммом № 2, темпами роста мицелия. Полученные от штамма № 1 мутанты характеризовались разнообразием культурально-морфологических параметров, при этом в среднем для них были характерны относительно невысокие скорости роста. Установлена значитель-

ная гетерогенность и для мутантов, полученных от родительского штамма № 2, для них в основном были отмечены высокие скорости роста. В жирнокислотных профилях указанных групп мутантов установлены значительные различия была на уровне прочих жирных кислот (табл. 2).

Таблица 2

Накопление биомассы и синтетическая продуктивность жирных кислот мицелием мутантных штаммов *Mortierella alpine* при глубинном культивировании (среда Чапека, 5 сут, 26 °С, повторность трехкратная, $p < 0,05$)

Table 2

Biomass accumulation and synthetic productivity of fatty acids by mycelium of mutant strains of *Mortierella alpine* during submerged cultivation (Czapek's medium, 5 days, 26 °C, threefold repetition, $p < 0,05$)

Штамм	Биомасса воздушно-сухого мицелия, г	Суммарное содержание жирных кислот, мг/г воздушно-сухого мицелия	Доля арахидоно-вой кислоты в профиле ПНЖК, %
Исходный штамм <i>M. alpine</i> , № 1			
<i>MrtA-1</i> (исходный, контроль)	3,43 ± 0,11	113,70 ± 5,3	16,9 ± 2,5
<i>MrtA-1-04</i>	3,28 ± 0,15	215,30 ± 3,8	31,3 ± 1,9
<i>MrtA-1-07</i>	4,35 ± 0,20	146,61 ± 2,6	26,6 ± 3,1
<i>MrtA-1-11</i>	2,45 ± 0,12	239,31 ± 10,1	33,2 ± 3,7
<i>MrtA-1-12</i>	4,26 ± 0,14	153,40 ± 12,2	18,1 ± 2,7
<i>MrtA-1-14</i>	3,21 ± 0,33	198,24 ± 11,7	16,9 ± 1,8
<i>MrtA-1-16</i>	2,44 ± 0,66	253,16 ± 20,1	28,4 ± 3,3
Исходный штамм <i>M. alpine</i> , № 2			
<i>MrtA-2</i> (исходный, контроль)	8,10 ± 0,15	92,60 ± 4,66	12,2 ± 1,8
<i>MrtA-2-02</i>	9,28 ± 0,22	85,24 ± 4,47	9,6 ± 0,7
<i>MrtA-2-05</i>	11,43 ± 0,34	79,35 ± 5,57	11,2 ± 1,6
<i>MrtA-2-06</i>	12,66 ± 0,33	69,46 ± 7,36	10,9 ± 1,6
<i>MrtA-2-10</i>	6,24 ± 0,25	133,37 ± 8,33	16,4 ± 2,1
<i>MrtA-2-12</i>	7,54 ± 0,37	112,25 ± 15,47	15,3 ± 1,6
<i>MrtA-2-13</i>	9,14 ± 0,60	81,74 ± 18,25	16,1 ± 1,3

Содержание жирных кислот в составе мицелия изученных групп мутантов различается, как и доли арахидоно-вой кислоты как целевого продукта, в общем профиле ПНЖК. В образцах, полученных в результате мутагенеза от исходного штамма № 1 обнаружено наиболее значительное пропорциональное содержание арахидоно-вой кислоты. Заметно, что объемы продукции жирных кислот выше у изолятов, характеризующихся относительно низкими темпами развития вегетативного мицелия. Это свидетельствует о том, что у продуктивных штаммов процессы вторичного метаболизма запускаются в более ранние сроки и превалируют над процессами первичного, определяющими вегетативный рост.

При работе с родительскими штаммами было установлено, что уровень синтеза арахидоно-вой кислоты мицелием достоверно зависит

от температурных параметров культивирования. Опираясь на данные, полученные для родительских культур, проведено изучение влияния пониженной и повышенной температур культивирования на пропорции жирных кислот в мицелии наиболее перспективных мутантных изолятов: *MrtA-1-04*, *MrtA-1-11* и *MrtA-1-16*. Установлено, что один из трех изученных изолятов (*MrtA-1-04*) показал достоверную стабильность продуктивных параметров как при повышенных, так и при пониженных температурах развития мицелия (табл. 3). Для второго из трех изученных штаммов (*MrtA-1-16*) показано расширение диапазона толерантности в сторону понижения температуры культивирования, а повышение температуры привело к сатурации жирных кислот и изменению пропорций жирнокислотного профиля (см. табл. 3).

Таблица 3

Влияние температуры культивирования на жирнокислотный состав мицелия штаммов *Mortierella alpina* (повторность трехкратная, $p < 0,05$, мг/г липидного экстракта)

Table 3

The effect of cultivation temperature on the fatty acid composition of the mycelium of strains *Mortierella alpina* (threefold repetition, $p < 0.05$, mg/g of lipid extract)

Жирные кислоты	Штамм <i>MrtA-1-04</i>			Штамм <i>MrtA-1-11</i>			Штамм <i>MrtA-1-16</i>		
	Температура культивирования, °C								
	28,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0	28,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0	28,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0
С 14:0 (миристиновая)	0,05 ± 0,03	—*	0,21 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01
С 16:0 (пальмитиновая)	0,48 ± 0,13	0,36 ± 0,09	0,83 ± 0,33	0,53 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,86 ± 0,03	0,74 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,94 ± 0,01
С 16:1 (пальмитолеиновая)	0,41 ± 0,06	0,30 ± 0,09	0,39 ± 0,11	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,31 ± 0,01
С 18:0 (стеариновая)	0,57 ± 0,06	0,15 ± 0,06	1,75 ± 0,66	0,03 ± 0,001	—*	0,12 ± 0,03	0,042 ± 0,001	0,042 ± 0,001	0,085 ± 0,003
С 18:1 (олеиновая)	97,0 ± 3,33	103,0 ± 3,43	78,6 ± 1,77	49,0 ± 1,13	52,5 ± 1,33	73,6 ± 1,33	79,0 ± 1,14	86,5 ± 1,33	66,6 ± 1,77
С 18:2 (линолевая)	0,25 ± 0,06	0,33 ± 0,01	—*	0,18 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,12 ± 0,01
С 18:3 (альфа-линоленовая)	0,54 ± 0,06	0,51 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,088 ± 0,003	0,06 ± 0,03	—*	0,06 ± 0,003	0,05 ± 0,007	—*
С 20:4 (арахионовая)	138,0 ± 3,33	133,0 ± 1,33	103,7 ± 1,33	141,8 ± 2,19	104,7 ± 1,77	43,3 ± 1,33	132,7 ± 2,66	126,0 ± 1,77	33,6 ± 1,33
С 20:5 (эйкозапентаеновая)	84,3 ± 1,66	102,8 ± 2,66	65,3 ± 1,11	50,8 ± 0,66	93,3 ± 0,77	22,4 ± 0,66	57,4 ± 0,33	104,3 ± 0,66	25,2 ± 0,13
С 24:0 (лигноцериновая)	—*	—*	0,09 ± 0,003	—*	—*	0,08 ± 0,001	0,048 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,09 ± 0,001
Высококипящие компоненты	≥ 0,60	≥ 0,45	≥ 0,65	≥ 0,75	≥ 0,35	≥ 0,75	≥ 0,75	≥ 0,35	≥ 0,75

Примечание. * ниже границы обнаружения.

Таким образом, использование приемов индуцированного мутагенеза позволило получить значительное количество мутантных штаммов – перспективных продуцентов ПНЖК. В составе пула фенотипически отличных штаммов отобраны изоляты, проявившие наиболее выраженные продуктивные свойства. Среди них удалось обнаружить штаммы, характеризующиеся относительно широкими диапазонами толерантности к изменениям температуры культивирования. Стабилизация активного синтеза арахидоновой кислоты как основного целевого метаболита *M. alpina* на фоне флуктуаций температурного фактора имеет важное практическое значение [16, 19]. В дальнейшем необходимо проведение исследований по оценке стабильности продуктивных свойств у отобранных штаммов при длительном хранении и множественных пересевах (изучение склон-

ности к спонтанным диссоциациям). Тем не менее определена возможность расширения температурных параметров культивирования продуцента арахидоновой кислоты *M. alpina* за счет использования селекционных штаммов с расширенными диапазонами температурной толерантности.

Заключение

Вариабельность мутантных штаммов *M. alpina* определяет формирование материала для скрининга термотолерантных продуктивных штаммов. Причем сохранение у термотолерантных штаммов указанной экологической характеристики в ряду поколений может служить маркером стабильности и продуктивных характеристик.

Список литературы

1. Kikukawa H., Sakuradani E., Ando A. [et al.]. Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4: A review. // J Adv Res. 2018. Vol. 11. P. 15–22. doi:10.1016/j.jare.2018.02.003
2. Миронов А. А. Оптимизация процесса биосинтеза арахидоновой кислоты грибами *Mortierella alpina* из глицерин-содержащих субстратов : дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 2022. 120 с.

3. Esfandiyari Mehni M., Samadlouie H. R., Rajaei A. Enhancement of oil productivity of *Mortierella alpina* and investigation into the potential of Pickering oil-in-water emulsions to improve its oxidative stability // *Food Sci Nutr*. 2021. Vol. 10. P. 103–114. doi:10.1002/fsn3.2651
4. Дедюхина Э. Г., Чистякова Т. И., Миронов А. А. [и др.]. Влияние pH, аэрации и температуры на синтез арахидоновой кислоты *Mortierella alpina* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51, № 2. С. 243–250.
5. Mironov A. A., Nemashkalov V. A., Stepanova N. N. [et al.]. The effect of pH and temperature on arachidonic acid production by glycerolgrown *Mortierella alpina* NRRL-A-10995 // *Fermentation-Basel*. 2018. Vol. 4, № 1. doi:10.3390/fermentation4010017
6. Миронов А. А., Немашкалов В. А. Влияние температуры на рост, синтез липидов и арахидоновой кислоты грибами *Mortierella alpina* NRRL-A-10995 // *Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов : сборник тезисов III Пушкинской школы-конференции (г. Пушкино, 5–9 декабря 2016 г.) / под ред. Т. А. Решетиловой*. Пушкино : Вода: химия и экология, 2016. С. 92–94.
7. Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М. : Наука, 1967. 312 с.
8. Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М. : МГУ, 1976. 206 с.
9. Stalpers J. A. Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture // *Stadies in Micology*. 1978. Vol. 16. 248 p.
10. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues // *The Journal of Biological Chemistry*. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
11. Герег Ш. Количественный анализ стероидов : пер. с англ. М. : Мир, 1985. 504 с.
12. Халафян А. А. *Statistica 6. Статистический анализ данных*. М. : Бином-Пресс, 2007. 512 с.
13. Осипенко А. Н. Влияние теплового воздействия на состав жирных кислот изолированных образцов крови: результаты и вероятные механизмы // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2, ч. 26. С. 5820–5826.
14. Belury M. A., Patrick K. E., Locniskar M., Fischer S. M. Eicosapentaenoic and arachidonic acid: comparison of metabolism and activity in murine epidermal cells // *Lipids*. 1989. № 24. P. 423–429. doi:10.1007/BF02535150
15. Инге-Вечтомов С. Г. *Генетика с основами селекции : учебник для студентов высших учебных заведений*. СПб. : Изд-во Н-Л, 2010. 720 с.
16. Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. С. 163–198.
17. Иванов А. И., Разживина Т. В. Дикорастущие популяции астрагала нутового (*Astragaluscicer* L.) как исходный материал для селекционной работы // *Нива Поволжья*. 2012. № 1. С. 9–13.
18. Егоров Н. С. *Биотехнология. Книга 2: Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов*. М. : Высшая школа, 1988. 208 с.
19. Ильина Г. В., Ильин Д. Ю., Сашенкова С. А. Приемы селекции олеагенных штаммов грибов // *Нива Поволжья*. 2017. № 2. С. 18–23.

References

1. Kikukawa H., Sakuradani E., Ando A. et al. Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4: A review. *J Adv Res*. 2018;11:15–22. doi:10.1016/j.jare.2018.02.003
2. Mironov A.A. Optimizing the process of biosynthesis of arachidonic acid by fungi *Mortierella alpina* from glycerol-containing substrates. PhD dissertation. Pushchino, 2022:120. (In Russ.)
3. Esfandiyari Mehni M., Samadlouie H.R., Rajaei A. Enhancement of oil productivity of *Mortierella alpina* and investigation into the potential of Pickering oil-in-water emulsions to improve its oxidative stability. *Food Sci Nutr*. 2021;10:103–114. doi:10.1002/fsn3.2651
4. Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Mironov A.A. et al. Influence of pH, aeration and temperature on the synthesis of arachidonic acid *Mortierella alpina*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* = Applied biochemistry and microbiology. 2015;51(2):243–250. (In Russ.)
5. Mironov A.A., Nemashkalov V.A., Stepanova N.N. et al. The effect of pH and temperature on arachidonic acid production by glycerolgrown *Mortierella alpina* NRRL-A-10995. *Fermentation-Basel*. 2018;4(1). doi:10.3390/fermentation4010017
6. Mironov A.A., Nemashkalov V.A. Influence of temperature on growth, synthesis of lipids and arachidonic acid by fungi *Mortierella alpina* NRRL-A-10995. *Biokhimiya, fiziologiya i biosfernaya rol' mikroorganizmov: sbornik tezisev III Pushchinskoy shkoly-konferentsii (g. Pushchino, 5–9 dekabrya 2016 g.)* = Biochemistry, physiology and the biospheric role of microorganisms: collection of abstracts of III Pushchino school-conference (Pushchino, December 5–9, 2016). Pushchino: Voda: khimiya i ekologiya, 2016:92–94. (In Russ.)
7. Litvinov M.A. *Opredelitel' mikroskopicheskikh pochvennykh gribov* = Field guide to microscopic soil fungi. Moscow: Nauka, 1967:312. (In Russ.)
8. Mirchink T.G. *Pochvennaya mikologiya* = Soil mycology. Moscow: MGU, 1976:206. (In Russ.)
9. Stalpers J.A. Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture. *Stadies in Micology*. 1978;16:248.
10. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957;226:497–509.

11. Gereg Sh. *Kolichestvennyy analiz steroidov: per. s angl.* = Quantitative analysis of steroids: translated from English. Moscow: Mir, 1985:504. (In Russ.)
12. Khalafyan A.A. *Statistica 6. Statisticheskiy analiz dannykh* = Statistics 6. Statistical data analysis. Moscow: Bionom-Press, 2007:512. (In Russ.)
13. Osipenko A.N. The effect of thermal exposure on the composition of fatty acids in isolated blood samples: results and probable mechanisms. *Fundamental'nye issledovaniya* = Basic research. 2015;(2):5820–5826. (In Russ.)
14. Belury M.A., Patrick K.E., Locniskar M., Fischer S.M. Eicosapentaenoic and arachidonic acid: comparison of metabolism and activity in murine epidermal cells. *Lipids*. 1989;(24):423–429. doi:10.1007/BF02535150
15. Inge-Vechtomov S.G. *Genetika s osnovami seleksii: uchebnik dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedeniy* = Genetics with the basics of selection: a textbook for students of higher educational institutions. Saint Petersburg: Izd-vo N-L, 2010:720. (In Russ.)
16. Los' D.A. Structure, regulation of expression and function of fatty acid desaturations. *Uspekhi biologicheskoy khimii* = Achievements in biological chemistry. 2001;41:163–198. (In Russ.)
17. Ivanov A.I., Razzhivina T.V. Wild-growing populations of *Astragaluscicer L.* as a starting material for breeding work. *Niva Povolzh'ya* = Volga region farmland. 2012;(1):9–13. (In Russ.)
18. Egorov N.S. *Biotekhnologiya. Kniga 2: Sovremennye metody sozdaniya promyshlennykh shtammov mikroorganizmov* = Biotechnology. Book 2: Modern methods for generating industrial strains of microorganisms. Moscow: Vysshaya shkola, 1988:208. (In Russ.)
19. Il'ina G.V., Il'in D.Yu., Sashenkova S.A. Selection techniques for settled strains of fungi. *Niva Povolzh'ya* = Volga region farmland . 2017;(2):18–23. (In Russ.)