

М.В. Пристай, О.В. Карпенко

Відділення фізико-хімії і технології горючих копалин ІнФОВ НАН України

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА АЗОТУ НА СИНТЕЗ ГЛІКОЛІПІДІВ, ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ І КАРОТИНОЇДІВ БАКТЕРІАЛЬНИМ ШТАМОМ *GORDONIA RUBRIPERTINCTA* УКМ Ас-122

© Пристай М.В., Карпенко О.В., 2009

Досліджено вплив різних джерел азоту (натрію нітрату, калію нітрату, амонію нітрату, амонію сульфату, дріжджового екстракту, пептону, сечовини) і їх сумішей на синтез гліколіпідів і екзополісахаридів бактеріальним штамом *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122.

The influence of different nitrogen sources (sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, yeast extract, peptone, carbamide) and its mixtures on synthesis of glycolipids and exopolysaccharides by bacterial strain *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 was determined.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Останнім часом бактерії роду *Gordonia* викликають значний інтерес завдяки їх здатності деградувати ксенобіотики – речовини, що забруднюють навколишнє середовище, важкодеградабельні природні полімери. Також вони здатні синтезувати корисні сполуки (наприклад, біосурфактанти, каротиноїди, полісахариди). Біосурфактанти – це поверхнево-активні сполуки природного походження, що мають важливі переваги порівняно з синтетичними аналогами: вони активні при екстремальних температурах, у широкому діапазоні рН, високих концентраціях солей, у морській воді. Вони нетоксичні, легко деградабельні, синтез може бути здійснений на основі дешевих субстратів, включаючи відходи виробництв. Сполуки мікробного походження можуть задовольнити сучасні потреби світового ринку у природних продуктах нового покоління (ефективних і екологічно безпечних), а також замінити синтетичні продукти в екологічно безпечних технологіях. Також каротиноїди, полісахариди і ПАР є надзвичайно перспективними для сучасних галузей промисловості, медицини і сільського господарства.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Дуже мало відомо про структуру і властивості поверхнево-активних сполук, що синтезуються бактеріями роду *Gordonia*. Найбільш вивченим видом у цьому плані є *Gordonia amarae*. Ці бактерії спричиняють піноутворення в активному мулі при очищенні стічних вод. Автори дослідили, що *Gordonia amarae* під час росту на водонерозчинних субстратах продукує два типи сполук – гліколіпіди, які знижують поверхневий натяг, і екзополісахариди, здані емульгувати гексадекан [1].

Багато видів *Gordonia* мають оранжеве, рожеве або червоне забарвлення колоній, що свідчить про їх здатність до синтезу каротиноїдів. Але ці сполуки ще дуже мало вивчені. Є дані, що штам *G. jacobaea* MV-1 синтезує кантаксантин [2], а штам *G. terrae* синтезує новий тип похідних каротиноїдів – глюкозил міколові естери каротиноїдів [3].

Попередньо було встановлено, що бактеріальний штам *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 синтезує поверхнево-активні трегалозоліпіди і каротиноїди, які разом екстрагуються розчином Фолча і залишаються стабільними на світлі впродовж тривалого часу. Хоча, як відомо, каротиноїди швидко окислюються на світлі, знебарвлюючись. Також цей штам синтезує екзополісахариди.

Метою роботи є дослідження впливу джерел азоту на синтез гліколіпідів, екзополісахаридів і каротиноїдів штамом *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122.

Проведення експерименту. Об'єкт досліджень – штам *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Умови культивування. Культивування мікроорганізмів проводили у колбах Ерленмейєра (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) при температурі 30⁰С упродовж 5 діб на середовищі Гудвіна [4] з різними модифікаціями. Джерелом вуглецю був гексадекан (2 % мас.). Як джерела азоту використовували натрію нітрат, калію нітрат, амонію нітрат, амонію сульфат, дріжджовий екстракт, пептон, сечовину. Також як додаткове джерело вуглецю і азоту використовували аспарагінову кислоту.

Як інокулят використовували культуральну рідину (КР) штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122, вирощеного на рідкому поживному середовищі із сахарозою в колбах Ерленмейєра впродовж двох діб при 30⁰С. Інокулят вносили у кількості 10 % від об'єму середовища.

Визначення біомаси. Біомасу клітин вимірювали гравіметричним методом [5]. КР центрифугували при 6000g упродовж 30 хв при кімнатній температурі. Отриманий осад клітин висушували при 70⁰С до постійної маси.

Визначення ліпідів і каротиноїдів. Кількість ліпідів визначали ваговим методом після їх екстракції з клітин розчином Фолча (хлороформ:метанол – 2:1) з подальшим упарюванням під вакуумом і зважуванням.

Визначення полісахаридів. Полісахариди визначали ваговим методом після їх осадження з супернатанту культуральної рідини етиловим спиртом і подальшим висушуванням при температурі 80⁰С до постійної маси.

Емульгувальну активність КР вивчали за індексом емульгування з вазеліною оливою (E_{24}) методом [6].

Якісний аналіз ліпідів і каротиноїдів визначали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у системах розчинників: хлороформ–метанол–вода (65:25:4), гексан–ацетон (7:3). Ідентифікацію ліпідів і каротиноїдів проводили після проявлення пластинок 5% спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і анісового альдегіду із застосуванням маркерного аналізу.

Результати та їх обговорення. Результати експериментів показали, що бактеріальний штам *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 здатний рости на всіх досліджуваних джерелах азоту, а саме на натрію нітраті, калію нітраті, амонію нітраті, амонію сульфаті, дріжджовому екстракті, пептоні, сечовині. Поверхнево-активні ліпіди і каротиноїди найкраще синтезуються на трьох джерелах азоту: натрію нітраті, калію нітраті, сечовині (3,9 – 4,9 г/л). Екзополісахариди ефективно синтезуються при використанні калію і натрію нітратів, дріжджовому екстракті і пептоні (4 – 5,75 г/л). При цьому емульгувальна активність досягала 100% на пептоні, 75% на сечовині, 70% на дріжджовому екстракті, а на інших джерелах була низькою – 10–25%.

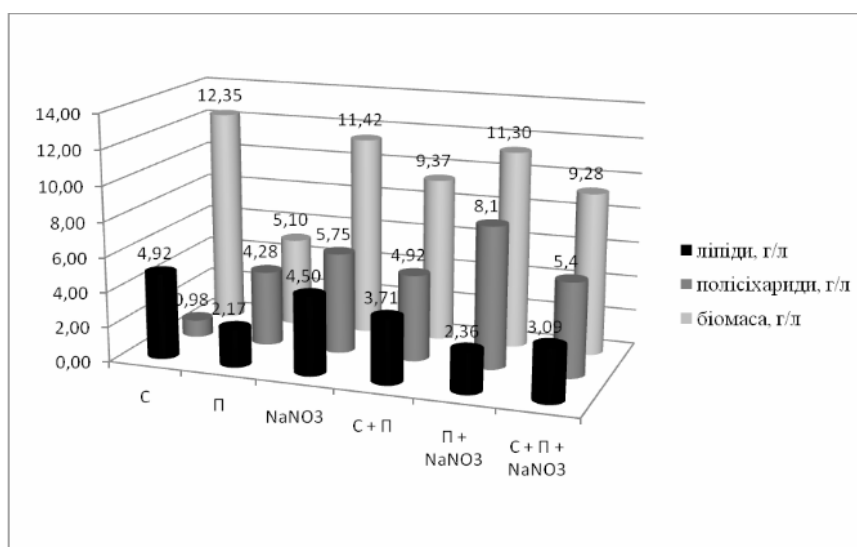
Враховуючи вищенаведені дані, а також літературні відомості про ефективність використання суміші джерел азоту [7], було досліджено вплив змішаних джерел азоту на синтез ПАР, каротиноїдів і полісахаридів цим штамом. Для цього вибрали три найкращі джерела азоту: натрію нітрат, сечовину і пептон. Дані подані на рисунку.

Отже, вперше було показано ефективність використання сечовини як джерела азоту для синтезу мікробних ПАР. Крім цього, застосування сечовини є економічно вигідним для отримання ПАР і каротиноїдів, оскільки вона має переваги: порівняно з нітратом натрію, що традиційно використовується в середовищі Гудвіна, за однакової ціни сечовини необхідно втричі менше (3 г NaNO_3 і 1 г сечовини).

Для отримання екзополісахаридів оптимальним виявилось застосування змішаного джерела азоту пептон: натрію нітрат 1:1, що дало змогу збільшити вихід екзополісахаридів до 8,1 г/л. Але доволі висока ціна на пептон робить його не вигідним. Оскільки пептон складається з амінокислот, було обрано аспарагінову кислоту, яка є відносно дешевою (50 г/кг порівняно з 400-800 г/кг за інші амінокислоти).

У дослідах використовували змішані джерела азоту: сечовина:аспарагінова кислота, нітрат натрію:аспарагінова кислота в різних концентраціях і співвідношеннях. У результаті показано, що застосування сечовини в концентрації 1 г/л і аспарагінової кислоти (1 г/л) дало змогу збільшити вихід екзополісахаридів до 9,2 г/л, а у присутності натрію нітрату (3 г/л) і аспарагінової

кислоти (0,5 г/л) – до 10 г/л екзополісахаридів. Також при використанні аспарагінової кислоти як додаткового джерела азоту і вуглецю збільшився вихід поверхнево-активних ліпідів і каротиноїдів до 6,2 г/л.



Біомаса, кількість трегалозоліпідів і екзополісахаридів штаму *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 при рості на різних джерелах азоту та їх сумішах: С – сечовина, П – пептон

Висновки. Вперше встановлено ефективність застосування сечовини як джерела азоту для біосинтезу поверхнево-активних ліпідів і каротиноїдів.

Встановлено, що використання змішаного джерела азоту сечовина : аспарагінова кислота дає змогу збільшити вихід трегалозоліпідів штаму *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 з 4,9 г/л до 6,2 г/л і екзополісахаридів з 4 до 9,2 г/л.

1. Pagilla K.R., Sood A., Kim H. *Gordonia (nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production // *Water Science and Technology*. 2002;46:519-524.
2. Veiga – Crespo P., Blasco L., Santos F.R., Poza M., Villa T.G. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on cantaxanthin production // *Int. Microbiol.* 2005;8:55–58.
3. Takaichi S., Maoka T., Akimoto N., Carmona M., Yamaoka Y. Carotenoids in a corynebacterineae, *Gordonia terrae* AIST-1:carotenoid glucosyl mycolyl esters // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008;72:80299-1-8.
4. Донець А.Т., Кошелев В.В., Бехтерева М.Н. Качественное и количественное содержание липидов у бактерий // *Микробиология*. – 1970;24(2). 300–304.
5. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхарда и др. – М.: Мир, 1983. – С. 535.
6. Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Карпенко О.В. Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів *Phaffia rhodozyma* // *Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки*. – 1990. – С.49–53.
7. Hui N., Qi-he C., Hui R., Yuan-fan Y., Guang-bin W., Yang H., Guo-ging H. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* // *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2007;8(5):365-370.