

2006. – С. 29–30. 4. Galabova D., Tuleva B., Spasova D. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100 // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1996. – Vol. 18. – P. 18–22. 5. Vasileva-Tankova E., Galabova D., Karpenko E. Shulga A.N. Biosurfactants-rhamnolipid effects on yeast cells // *Letters in Applied Microbiology*, 2001, V/33, P/280-284. 6. Benckekroun K., Bonaly R. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in the presence of surfactants // *Applied and Microbial Biotechnology*. – 1992. – Vol. 36. – P. 673–678. 7. Берендеева Л.Л. Выявление токсичных концентраций СПАВ в поливных водах и биохимическая деятельность почвенных микроорганизмов азотного цикла на фоне этих концентраций // *Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах (Тр. IV Всес. Совещ. Обнинск, 1983)*. Л.: Гидрометеоздат. – 1985. – С. 192–194. 8. Milner J.L., Araujo R.S., Handelsman J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutant of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 // *Mol. Microbial.* – 1992. – Vol. 6. – P. 3137–3147. 9. Streeter J.G. Failure of inoculant *Rhizobia* to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation // *Can. J. Microbial.* – 1994. – Vol. 40. – P. 513–522. 10. McDermott T.R., Graham P.H. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 3035–3039. Roch F., Alexander M. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1995. – Vol. 14. – P. 1151–1158. 11. Shulga A., Karpenko E., Vildanova-Martshishin R., Turovsky A., Soltys M. Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments // *Adsorp. Sci. Technol.* – 2000. – Vol. 18, № 2. – P. 171–176. 12. Karpenko E.V., Shulga A.N., Shcheglova N.S., Elyseev S.A., Vildanova-Martshishin R.I., Turovsky A.A. Surface-active compounds by *Pseudomonas sp. PS-27* // *Microbiol.J.* – 1996. – Vol.58, № 5. – P. 18–24. 13. *Methods of soils microbiology and biochemistry / Zvyagintsev D.G.* // Moscow, 1991, 223. 14. John W. Larsen and Susan Shawver. Solvent Swelling Studies of Two Low-Rank Coals // *Energy & Fuels*. – 1990. – Vol. 4, No. 1. – P. 74–77.

УДК 579.841.222

М.В. Пристай\*, О.В. Карпенко\*, Р.О. Петріна, Т.М. Ногіна\*\*

Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,

\*Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії  
ім. Л. М. Литвиненка НАН України

\*\* Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

## ПОШУК НОВИХ ЕФЕКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ БІОСУРФАКТАНТІВ І КАРОТИНОЇДІВ СЕРЕД ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *RHODOCOCCLUS* І *GORDONIA*

© Пристай М.В., Карпенко О.В., Петріна Р.О., Ногіна Т.М., 2007

Здійснено скринінг штамів актинобактерій родів *Gordonia* і *Rhodococcus* на здатність продукувати поверхнево-активні речовини і каротиноїди під час росту на гідрофільних і гідрофобних субстратах.

Screening of actinobacteria strains of the genera *Gordonia* and *Rhodococcus* for ability to produce biosurfactants and carotenoids on hydrophilic and hydrophobic substrates was carried out.

**Постановка проблеми.** Біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР, біосурфактанти) є одними з найперспективніших продуктів мікробного синтезу. Вони нетоксичні, легко деградуєбельні, екологічно безпечні. Синтез цих речовин можна здійснити на основі дешевих субстратів,

включаючи відходи виробництв. Фізико-хімічні і біологічні властивості біоПАР роблять їх придатними для застосування у фармакології, медицині, сільському господарстві, для очищення забруднених ґрунтів і води. Каротиноїди – це водонерозчинні провітаміни, які проявляють антиоксидантні властивості. Гідрофобність негативно впливає на засвоюваність каротиноїдів організмом людини і тварин під час їх використання в медицині, або як домішок для корму тварин. У комплексі з біоПАР каротиноїди здатні солюбілізуватися у водних розчинах, що покращує їх харчові та фармакологічні характеристики. Враховуючи важливе значення, яке мають каротиноїди у перебігу нормальних фізіологічних процесів в організмі людини та тварин, актуальним залишається завдання з створення профілактичних та лікарських препаратів на їх основі.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Актинобактерії роду *Gordonia* є потенційними продуцентами широкого спектра каротиноїдних сполук [1], а також можуть продукувати сурфактанти [2, 3]. Такі поліфункціональні біосинтетичні властивості гордоній мають особливе значення для отримання каротиноїдів, що використовуються у харчовій промисловості та як кормові вітамінні домішки у сільському господарстві. Відомо, що представники родів *Gordonia* і *Rhodococcus* здатні засвоювати широкий спектр вуглеводневих сполук і широко застосовуватися у сучасних біотехнологіях очистки ґрунтів і води від нафти та нафтопродуктів [4]. У процесах розкладу зазначених гідрофобних субстратів цими бактеріями активну участь беруть клітинні ліпіди, які проявляють поверхнево-активні властивості [5]. У родококів та гордоній такими ліпідами є міколові кислоти (високомолекулярні  $\alpha$ -розгалужені  $\beta$ -гідрооксильовані жирні кислоти) та їх трегалозоефіри, що асоційовані з клітиною і формують основу ліпідного бар'єру клітинної стінки, через який відбувається проникнення у клітину гідрофобних речовин [5]. Можна вважати, що у транспортних процесах важливе значення мають поверхнево-активні властивості вказаних ліпідів, зокрема, трегалозомономіколатів. Аналіз літератури показує, що гордонії та родококи здатні синтезувати біоПАР, активність синтезу яких значно більша на вуглеводневих субстратах [6, 7].

Все вищезазначене зумовлює актуальність та доцільність дослідження здатності штамів *Gordonia rubripertincta* і *Rhodococcus erythropolis* синтезувати біоПАР і каротиноїди.

**Експериментальна частина.** Об'єктами досліджень були штами нокардіоподібних актинобактерій видів *Gordonia rubripertincta* і *Rhodococcus erythropolis* з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Культивування мікроорганізмів проводили у колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) при температурі 30°C упродовж 5 діб на середовищі Гудвіна [10]. Джерелом вуглецю слугували сахароза, етиловий спирт і гексадекан (2 % мас.).

Як інокулянт використовували культуральну рідину (КР) штамів *G. rubripertincta* і *R. erythropolis*, вирощених на рідкому живильному середовищі із сахарозою в колбах Ерленмейера протягом двох діб при 30°C. Інокулянт вносили у кількості 10 % від об'єму середовища.

Біомасу клітин вимірювали ваговим методом [11]. КР центрифугували при 6000g упродовж 30 хв. при кімнатній температурі. Отриманий осад клітин висушували при 70°C до постійної ваги.

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

Емульгуючу активність КР вивчали за індексом емульгування ( $E_{24}$ ) методом [12].

Дослідження поверхневого натягу (ПН) проводили за методом Вільгельмі з використанням платинової пластинки [11].

Якісний аналіз ліпідів і каротиноїдів вивчали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у системах розчинників: хлороформ-метанол-вода (85:15:2), хлороформ-метанол-вода (65:25:4), гексан-діетиловий ефір (2:1), гексан-ацетон (7:3). Ідентифікацію ліпідів і каротиноїдів проводили після проявлення пластинок 5%-им спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і анісовим альдегідом із застосуванням маркерного аналізу.

**Результати досліджень.** У цій роботі був проведений скринінг 12 штамів *G.rubripertincta* і 5 штамів *R.erythropolis* на їх здатність синтезувати біоПАР під час росту на різних субстратах. Встановлено, що штами *G.rubropertincta* здатні засвоювати, як водорозчинні (сахарозу, етиловий

спирт), так і водонерозчинні (гексадекан) джерела вуглецю. В основному ефективнішими субстратами для синтезу біоПАР є гідрофобні речовини, хоча для деяких штамів здатність продукувати біоПАР при рості на сахарозі є також досить значною, іноді навіть вищою, ніж на гексадекані. У разі росту на етиловому спирті досліджені штами показали найнижчу ПАР-синтезуючу активність.

Виявлено, що майже всі штами *G. rubripertincta* здатні синтезувати каротиноїди. Найоптимальнішим субстратом для синтезу каротиноїдів є сахароза, при рості на спирті здатність продукувати ці речовин була меншою, а на гексадекані їх синтез практично не спостерігався.

Загалом тестовані штами *G. rubripertincta* показали середню і низьку ПАР-синтезуючу активність (0,5 – 3,5 г/л ліпідів), але емульгуюча активність майже всіх штамів, за винятком *G. rubripertincta* УКМ Ас-122, УКМ Ас-171, УКМ Ас-175 та УКМ Ас-179, індекс емульгування яких знаходився в межах 40 – 60%, була дуже низькою. Поверхневий натяг СН цих культур дорівнював 30,7 – 65,8 мН/м. Перспективними, як продуценти біоПАР, можна вважати штами *G. rubripertincta* УКМ Ас-122, УКМ Ас-135, УКМ Ас-138, УКМ Ас-190 та ІМВ Ас-5005.

Той факт, що СН гордоній не показують надзвичайно низьких ПН і володіють низькою емульгуючою здатністю, ймовірно пов'язаний з тим, що більшість поверхнево-активних ліпідів залишаються асоційованими з клітинною стінкою. Враховуючи те, що на величину поверхневого натягу може впливати наявність в СН інших речовин (солей, білків тощо), ми дослідили ПН водних розчинів ліпідних екстрактів деяких супернатантів. Наприклад, для штаму *G. rubripertincta* ІМВ Ас-5005 поверхневий натяг СН під час росту на гексадекані дорівнював 45,8 мН/м, а ПН позаклітинних ліпідів – 34,1 мН/м, для штаму *G. rubripertincta* УКМ-Ас 138 вказані значення ПН становили 46,8 і 40,2 мН/м, відповідно. Отже, для виділених із супернатанту позаклітинних ліпідів показники поверхневого натягу водних розчинів мають значно нижчі значення. Порівняльне дослідження поверхневого натягу СН, водних розчинів позаклітинних і клітинних ліпідів підтверджує той факт, що більшість біоПАР гордоній асоційовані з клітинною стінкою досліджених бактерій (рис. 1).

Детальніше дослідження штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122, який за попередніми даними, виявився перспективним для синтезу біоПАР у комплексі з каротиноїдами, показало, що вказаний штам характеризується високим рівнем виходу біомаси на сахарозі і гексадекані, має порівняно високу емульгуючу активність на всіх, окрім вазелінової олії, субстратах. Найнижчий ПН виявлено у цього штаму під час росту на сахарозі, хоча при засвоєнні гексадекану продукується більше біоПАР (ліпідів). Це явище, на нашу думку, можна пояснити тим фактом, що цей штам під час росту на сахарозі продукує ще й каротиноїди, які в комплексі з біоПАР ефективніше знижують ПН. Разом з тим, у разі засвоєння гексадекану синтез каротиноїдів майже відсутній, про що свідчить незначна інтенсивність оранжево-рожевого забарвлення біомаси. Під час збільшення часу культивування з 120 год до 144 год показники біомаси і емульгуюча активність залишалися стабільними, але зменшилась кількість ліпідів і, відповідно, збільшився ПН. Вазелінова олія як субстрат росту показала найгірші значення для всіх вимірюваних параметрів.

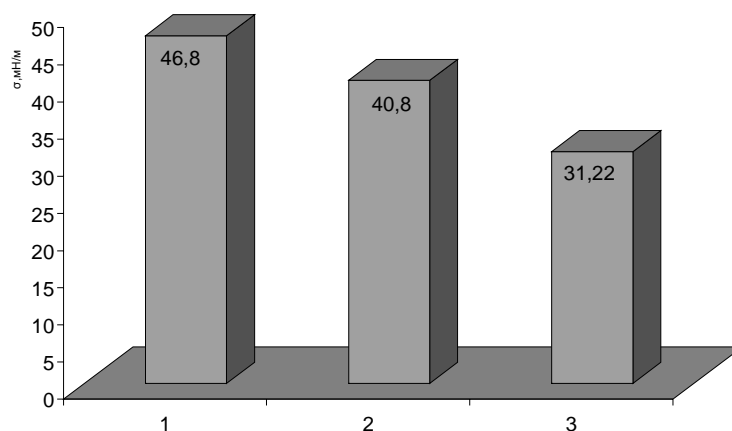


Рис. 1. Поверхневий натяг супернатанту (1), позаклітинних ліпідів (2) та клітинних ліпідів (3) *G. rubripertincta* УКМ Ас-135 під час росту на гексадекані

Результати тестування штаму *G.rubripertincta* УКМ Ас-122 під час культивування на середовищі з різними джерелами вуглецю протягом 5 і 6 діб

Штами МО	Джерело вуглецю, 20 г/л	Час культивування, год	Біомаса, г/л	E <sub>24</sub> , %	σ, мН/м	ліпіди, г/л	
						з біомаси	з СН
<i>Gordonia rubripertincta</i> УКМ Ас-122	сахароза	120	8,2	62	45,85	0,935	0,33
		120	9,8	56	42,55	0,627	0,235
		120	6,3	44	45,85	0,935	0,33
	етиловий спирт	120	1,7	26	56,24	0,735	0,39
		120	6	47	58,60	0,35	0,195
	гексадекан	120	8,6	55	47,27	1,53	1,2
		120	10	27	53,88	1,61	0,52
	вазелинова олія	120	2,3	2	51,52	0,32	0,25
	сахароза	144	7,4	45	51,52	0,28	0,22
	гексадекан	144	10,4	48	56,24	0,32	0,12

Під час вивчення здатності штамів *R.erythropolis* засвоювати водорозчинні та водонерозчинні субстрати виявлено, що їх ріст на сахарозі і етиловому спирті характеризується нижчим синтезом поверхнево-активного продукту (0,5 – 1,4 г/л), ніж на гексадекані (1,4 – 3,4 г/л), що підтверджується і найнижчим значенням ПН для СН культур, вирощених на цьому субстраті (36,9 – 39,2 мН/м). Показано, також, що на відміну від представників виду *G.rubripertincta*, штами *R.erythropolis* не синтезують каротиноїди. Індекс емульгування був високий тільки для СН штаму *R.erythropolis* АИ-1 (83,0 %). У вказаного штаму під час росту на гексадекані було визначено ПН для різних продуктів. Поверхневий натяг КР дорівнював 48,2 мН/м, СН – 50,8 мН/м, позаклітинних ліпідів – 49,6 мН/м та клітинних ліпідів – 35,9 мН/м.

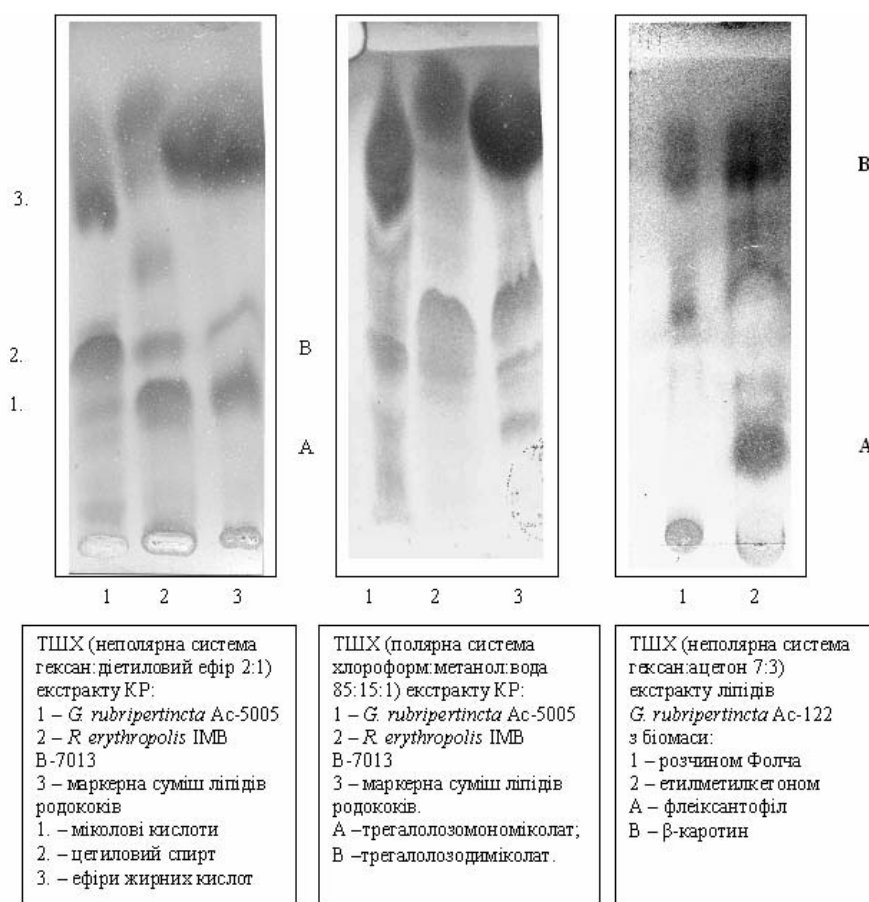


Рис. 2

Рис. 3

Рис. 4

Отже, внаслідок проведених досліджень встановлено, що більшість поверхнево-активних ліпідів у штамів гордоній та родококів асоційована з клітинною стінкою, про що свідчить набагато нижче значення ПН для клітинних ліпідів щодо поверхневого натягу культуральної рідини і супернатанту.

Для ідентифікації клітинних, позаклітинних ліпідів і каротиноїдів була використана тонкошарова хроматографія. Методом маркерного аналізу (порівняння Rf з еталоном) визначено, що у складі полярних і неполярних ліпідів переважають фракції, які ідентифіковані як трегалозо-мономіколат, трегалозодиміколат, міколові кислоти, цетиловий спирт, ефіри жирних кислот. Серед каротиноїдів переважають  $\beta$ -каротин і флейксантофіл (рис. 2, 3, 4).

**Висновки.** 1. Актинобактерії видів *G.rubripertincta* і *R.erythropolis* при рості на гідрофільних і гідрофобних субстратах продукують біоПАР, основним компонентом яких є трегалозоліпиди, а саме моно- та диміколати трегалози.

2. Штами *G. rubripertincta* здатні до синтезу каротиноїдів, більша кількість яких утворюється при рості на гідрофільних, ніж на гідрофобних (гексадекан) субстратах. У складі каротиноїдів гордоній виявлені  $\beta$ -каротин і флейксантофіл.

3. Здатність досліджених штамів гордоній та родококів до синтезу біоПАР свідчать про перспективність їх використання в біотехнології очищення доквілля від вуглеводнів нафти.

4. Біосинтез каротиноїдів у комплексі з біоПАР у деяких досліджених штамів зумовлює перспективу їх застосування для отримання цінних вітамінних домішок, фармацевтичних і сільськогосподарських препаратів.

1. Arenskotter M. *Biology of the metabolically diverse genus Gordonia* // *Apl. and Env. Microbiology*. – 2004 – V.70 – P. 3195–3204 2. Keisuke Iwahori, Takaaki Takutomi, Naoyuki Miyata, Masanori Fujita. *Formation of Stable Foam by the Cells and Culture Supernatant of Gordonia (Nocardia) amarae*. *J. Biosci. Bioeng. Vol. 92, No. 1, 77-79. 2001.* 3. K.P.Pagilla, A.Sood, H.Kim. *Gordonia (Nocardia) amarae foaming due to biosurfactant production. Water Science and Technology, Vol.46, No. 1-2, pp. 519-524 © IWA Publishing 2002.* 4. Bredholt H., Bruheim P., Potocky M., Eimhjellen K. *Hydrophobicity development, alkane oxidation, and crude-oil emulsification in a Rhodococcus species* // *Can. J. Microbiol.* – 2002. – V.48. – N 2. – P. 295–304. 5. A.Kretschmer, H.Bock., F.Wagner. *Oct.1982, P. 864–870. Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from Rhodococcus erythropolis Grown on n-Alkanes* // *Appl. Envir.Microbiol.* – Oct. 1982 – P. 864–870. 6. Коронелли Т.В. *Поступление углеводов в клетки микроорганизмов. – Успехи микробиологии. – 1980. – №15. – С. 99–111.* 7. Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P. *Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of Rhodococcus erythropolis E1* // *Appl. Envir.Microbiol.* – 2003. – V. 69. – N 12. – P. 7019 – 7027. 8. Hafnerburg D., Hommel R., Claus R., Kleber H.-P. *Extracellular microbial lipids as biosurfactants* // *Adv. in Biochemical Engineering / Biotechnology. Berlin; New York; Tokyo, 1986. – V.33. – P. 53 – 93.* 9. Lang S., Philp J.C. *Surface-active lipids in Rhodococci* // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1998. – V.74. – N1. – P. 59 – 70. 10. Донець А.Т., Кошелев В.В., Бехтерева М.Н. *Качественное и количественное содержание липидов у бактерий* // *Микробиология. –1970. – Т.24. – №2. – С. 300 – 304.* 11. *Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхарда и др. – М.: Мир, 1983. – Т.1. – 535 с.* 12. Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Карпенко О.В. *Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів Rhaffia rhodozuma.* // *Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки. – 1990. – № 8. – С. 49–53.*