

С.Л. Голембівська, С.Г. Тимошенко, Б.П. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДО3680, Україна**ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ ВУГЛЕЦЮ І АЗОТУ НА БІОСИНТЕЗ ЛІКОПІНУ
У *STREPTOMYCES GLOBISPORUS 4Lcp***

Досліджено синтез лікопіну штамом *Streptomyces globisporus 4Lcp* на синтетичних середовищах з різними джерелами вуглецю і азоту. Показано, що в умовах вирощування культури в колбах на качалках, найбільший вихід лікопіну (2,0 – 3,0 мг/л) спостерігається на середовищі з гліцерином у якості вуглецевого субстрату і нітратом натрію або калію як джерелом азоту. Нижчі результати були одержані за використання глюкози, крохмалю, ацетату натрію і тризаміщеного цитрату натрію як джерел вуглецю, а також нітрату і хлориду амонію як джерел азоту. Такі субстрати як етанол, сахароза, гідрофосфат та сульфат амонію і сечовина виявились несприятливими для біосинтезу лікопіну досліджуваною культурою стрептоміцета.

К л ю ч о в і с л о в а: *Streptomyces globisporus 4Lcp*, синтетичні середовища, лікопін.

В природних умовах мікроорганізми зазвичай здатні використовувати різноманітні субстрати для забезпечення своїх потреб в енергії та попередниках для синтезу первинних та вторинних метаболітів. Така здатність мікроорганізмів зумовлена широкими можливостями їх ферментативних систем, які функціонують конститутивно (незалежно від субстрату), або регулюються ним позитивно (індукція) чи негативно (репресія). Ферменти біосинтезу вторинних метаболітів у мікробів у більшості випадків піддаються регуляції [7].

Синтез такого вторинного метаболіту як лікопін, природного антиоксиданту, переважно характерний для клітин вищих рослин, однак також властивий деяким видам бактерій та дріжджів [9]. Представники родів *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Mucor* синтезують лікопін у кількостях 0,1–1,0% від сухої біомаси і тому можуть слугувати джерелом для одержання цього каротиноїду [1]. У представників стрептоміцетів синтез лікопіну в кількості 80% від суми всіх каротиноїдів був описаний у *Streptomyces globisporus 4Lcp* при вирощуванні на повноцінних середовищах [3, 4]. Дослідження біосинтезу лікопіну цим штамом на синтетичних середовищах не проводилось, хоча вони мають ряд переваг порівняно з повноцінними природними. Зокрема, через високу стабільність хімічного складу використання синтетичного середовища дозволяє досягти високого рівня відтворюваності результатів та уникати небажаних домішок, що можуть впливати на хід експерименту та якість кінцевого продукту.

З даних літератури відомо, що штами стрептоміцетів – промислових продуцентів антибіотиків потребують різних вуглець- та азотовмісних сполук. Так, *Streptomyces griseus* (продуцент стрептоміцину) не використовує нітрат як джерело азоту [11] і добре засвоює амоній подібно до інших стрептоміцетів – *S. noursei* (ністатин) [13], *S. aureofaciens* (хлортетрациклін) [5]; оптимальним джерелом вуглецю для цих мікроорганізмів є глюкоза. Однак *S. fradiae* (неоміцин) [14] добре засвоює декстрин, крохмаль та мальтозу як джерела вуглецю і нітрат натрію, аспаргат та глутамат як джерела азоту. Для *S. kanamyceticus* (канаміцин) [10] найбільш сприятливим є середовище із галактозою та нітратом, а *S. natalensis*, продуцент натаміцину, добре засвоює сульфат та нітрат амонію в поєднанні із глюкозою [12]. Особливо важливим є те, що деякі стрептоміцети, зокрема *S. chrysomallus* (аурантин) і *S. subtropicus* (альбоміцин), синтезують антибіотики лише за наявності нітрату в поживному середовищі [5].

Отже, як бачимо з наведеної літератури, в кожному конкретному випадку необхідно окремо досліджувати відношення культури продуцента антибіотика чи іншого вторинного метаболіту до різних джерел азоту і вуглецю. Тож метою даного дослідження було знайти оптимальний вуглецевий та азотний субстрат для біосинтезу лікопіну штамом *Streptomyces globisporus 4Lcp*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був лікопінсинтезуючий штам *4Lcp*, одержаний внаслідок спонтанної мінливості каротинсинтезуючого штаму *S. globisporus 4Crt* [4].

Вивчення впливу різних джерел азоту і вуглецю на біосинтез лікопіну проводили в наступній послідовності. Культуру *S. globisporus 4Lcp* вирощували протягом 5 діб на агаризованому картопляному середовищі в пробірках діаметром 18 мм. Для одержання посівного матеріалу поверхневий міцелій змивали стерильною дистильованою водою і вносили в колбу з рідким картопляним середовищем, склад якого описано попередньо [3]. Культивування проводили впродовж 24 годин в умовах постійного струшування на качалці при 240 об/хв. Посівний матеріал в кількості 10 % вносили в колби об'ємом 0,75 л, що містили по 50 мл досліджуваних синтетичних середовищ.

Як джерела вуглецю використовували глюкозу, крохмаль, гліцерин, сахарозу, ацетат, цитрат і етанол в кількості 1 % [7]. В якості джерел азоту було досліджено нітрати калію, натрію і амонію, хлорид, сульфат та гідрофосфат амонію і сечовину в кількості 0,5 %. Інші мінеральні речовини вносили в усі середовища в такій кількості (%): K_2HPO_4 – 0,075; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05; $NaCl$ – 0,05; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001. Для порівняння отриманих результатів було проведено культивування на стандартних синтетичних середовищах рекомендованих для культивування стрептоміцетів, склад яких наведено у табл. 2 [2, 6, 8, 16].

У ході експериментів культуру продуцента вирощували на вищезгаданих середовищах в колбах на качалках при 240 об/хв і температурі 28 °C протягом 72 год. По закінченню культивування одержаний міцелій відмивали від середовища дистильованою водою, осаджували центрифугуванням при 4190 g протягом 10 хв і висувували до постійної ваги в сушильній шафі при 70 °C. Суху біомасу (СБМ) розтирали з кварцовим піском у фарфоровій ступці і екстрагували каротиноїди ацетоном до повного знебарвлення розтертої біомаси. Отриманий екстракт очищали від залишків біомаси та піску центрифугуванням при 8050 g протягом 5 хв. Спектри поглинання екстрагованих пігментів одержували за допомогою спектрофотометра Beckman DU-8B (Beckman Instruments, США). Кількісне визначення індивідуальних каротиноїдів, очищених за допомогою тонкошарової хроматографії, проводили за оптичною густиною при відповідних максимумах поглинання враховуючи специфічні коефіцієнти абсорбції стандартними розчинами за стандартних умов ($A_{1cm}^{1\%}$) [3].

Результати та їх обговорення. Залежність біосинтезу лікопіну культурою *S. globisporus 4Lcp* від найважливіших компонентів середовища – джерел вуглецю та азоту було досліджено на синтетичних середовищах із постійним складом інших мінеральних сполук.

Результати культивування штаму *S. globisporus 4Lcp* на середовищах із різними джерелами вуглецю наведено в табл. 1. Як видно із даних цієї таблиці, найбільший урожай біомаси було одержано у випадку внесення в середовище гліцерину, а максимальний вміст лікопіну в біомасі – на середовищі з цитратом натрію. Синтез лікопіну також мав високі показники на середовищах із глюкозою і ацетатом натрію. На середовищах з сахарозою і етанолом візуально зафіксовано незначний рівень синтезу лікопіну, тому подальші дослідження з цими джерелами не проводилися. Таким чином, було встановлено, що глюкоза, гліцерин і цитрат натрію, порівняно з іншими досліджуваними субстратами, є найбільш сприятливими і можуть бути використані для біосинтезу лікопіну досліджуваним штамом.

На наступному етапі було досліджено вплив різних джерел азоту на продукування лікопіну. Вищезгадані азотовмісні сполуки в кількості 0,5 % було додано до середовища з 1 % гліцерину, що виявилось найбільш сприятливим у попередньому експерименті. З отриманих даних, наведених в табл. 2, видно, що оптимальним джерелом азоту і для накопичення біомаси і для синтезу лікопіну є нітрати калію та натрію. Сечовина, гідрофосфат та сульфат амонію як джерела азоту виявились несприятливими. Дуже низький рівень синтезу лікопіну було зафіксовано візуально, а тому в подальшому кількісне визначення біомаси і лікопіну не проводилося.

Таким чином, було визначено, що амонійні солі є менш сприятливими для біосинтезу лікопіну досліджуваним штамом порівняно із нітратом калію чи натрію. Відсутність різниці в результатах культивування на нітратах і хлориді амонію узгоджується з літературними даними про те, що іони амонію є найбільш легкодоступним джерелом азоту. Однак літературні дані також свідчать про те, що амонійний азот може блокувати синтез антибіотиків у деяких видів стрептоміцетів [15].

Для порівняння одержаних результатів біосинтезу лікопіну культурою *S. globisporus 4Lcp* було проведено культивування цього продуцента на десятих стандартних синтетичних сере-

довищах. Склад використаних середовищ наведено у табл. 3. Як видно із даних табл. 3, вказані середовища містили досліджені раніше джерела вуглецю – глюкозу, гліцерин, крохмаль та цитрат і різні джерела азоту – нітрати, амонійні солі, сечовину і L-аспарагін. Із інших мінеральних сполук солі фосфору, магнію, натрію і заліза були спільними для майже всіх середовищ, а карбонат кальцію для запобігання зниженню рН середовища вносився тільки у деякі середовища.

Результати вирощування культури *S. globisporus* 4Lcp на вказаних вище середовищах наведені в табл. 4, з якої видно, що найвищий вихід лікопіну (2,0 – 3,0 мг/л) спостерігався на трьох середовищах, які містили нітрат як джерело азоту і глюкозу, гліцерин та крохмаль як джерело вуглецю. Увагу привертало низькі значення рН після культивування продуцента лікопіну на середовищах з глюкозою без CaCO₃. Показники рН на середовищах з глюкозою та без CaCO₃ значно знижувалися, тоді як після культивування на інших субстратах – середовище було нейтральними або слабколужними. За даними літератури саме слабколужне рН є сприятливим для біосинтезу лікопіну [9]. Поряд із цим, закислення середовища внаслідок утворення органічних кислот при метаболізмі глюкози, за наявності в середовищі нітратів зумовлює і негативний вплив на продуцента. Як відомо, проміжні продукти асиміляційної нітратредукції – нітрит-іони, сполучаючись з іонами водню в кислому середовищі, утворюють азотисту кислоту, яка є токсичним дезамінуючим та мутагенним агентом. Присутність карбонату кальцію в середовищі Красильнікова СРІ частково нейтралізує закислення в процесі метаболізму глюкози, чим ми і пояснюємо значну різницю у рН та вмісті лікопіну при культивуванні на цьому середовищі, порівняно з середовищем Чапека.

Таким чином, на підставі результатів даної роботи було встановлено, що для *S. globisporus* 4Lcp як продуцента лікопіну слід використовувати такі джерела вуглецю як глюкоза, гліцерин, та цитрат натрію. Як джерела азоту найбільш сприятливими для вказаного штаму виявились нітрати – NaNO₃ та KNO₃. Можна припустити, що індукцйбельний характер утворення нітратредуктаз у *S. globisporus* невідомим чином сприяє біосинтезу каротиноїдів. Однак нітрат як джерело азоту, за умови зниження рН в процесі культивування, негативно впливав на біосинтез лікопіну.

Таблиця 1

Залежність біосинтезу лікопіну від джерела вуглецю

| Джерело вуглецю, 1 % | Кількість СБМ, г/л | Лікопін, мг/г СБМ |
|----------------------|--------------------|-------------------|
| Гліцерин | 2,50 ± 0,13 | 1,1 ± 0,06 |
| Крохмаль | 1,00 ± 0,05 | 0,72 ± 0,04 |
| Глюкоза | 1,60 ± 0,08 | 1,08 ± 0,06 |
| Ацетат | 1,80 ± 0,09 | 1,0 ± 0,05 |
| Цитрат | 1,50 ± 0,08 | 1,2 ± 0,06 |

Примітка: * Інші спільні компоненти середовищ (%): NaNO₃ – 0,1; K₂HPO₄ – 0,075; MgSO₄ × 7H₂O – 0,05; NaCl – 0,05; FeSO₄ × 7H₂O – 0,001.

Таблиця 2

Накопичення біомаси і лікопіну мутантом 4Lcp на середовищах із різним джерелом азоту

| Джерело азоту, 0,5 % | Кількість СБМ, г/л | Лікопін, мг/г СБМ |
|----------------------|--------------------|-------------------|
| Нітрат натрію | 2,00 ± 0,10 | 1,1 ± 0,06 |
| Нітрат калію | 2,00 ± 0,10 | 1,1 ± 0,06 |
| Нітрат амонію | 2,00 ± 0,10 | 0,9 ± 0,05 |
| Хлорид амонію | 2,00 ± 0,10 | 0,9 ± 0,05 |

Примітка: * Інші спільні компоненти середовищ (%): гліцерин – 1,0; солі наведені в табл. 1.

Склад середовищ, використаних у роботі [2, 6, 8, 16]

| Середовище | Склад середовища, % | | | | | | CaCO ₃ |
|----------------------|--------------------------|--|---------------------------------|---|------|---|-------------------|
| | Джерело | | K ₂ HPO ₄ | MgSO ₄ ×7H ₂ O | NaCl | FeSO ₄ ×7H ₂ O | |
| | вуглецю | азоту | | | | | |
| Красильнікова СРІ | Глюкоза 2,0 | KNO ₃ 0,2 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | 0,3 |
| Чапека з глюкозою | Глюкоза 2,0 | NaNO ₃ 0,3 | 0,1 | 0,05 | 0,05 | 0,005 | |
| Глюкозо-аспарагінове | Глюкоза 1,0 | L-аспарагін 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | |
| Глюкозо-амонійне* | Глюкоза 1,0 | (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,002 | |
| Гліцерино-амонійне | Гліцерин 1,0 | NH ₄ Cl 0,1 | 0,1 | 0,05 | 0,05 | | 0,1 |
| Гліцерин – сечовина | Гліцерин 1,5 | Сечовина 0,2 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | |
| Гліцерино-нітратне | Гліцерин 3,0 | NaNO ₃ 0,2 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | |
| Гаузе №1 | Крохмаль 2,0 | NaNO ₃ 0,2 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | |
| Крохмально-амонійне | Крохмаль 1,0 | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | | 0,3 |
| Сотона | Цитрат 0,2 Гліцерин 6 | L-аспарагін 0,4 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,001 | |

Примітка: * Окрім зазначеного в таблиці вносили (%): CaCl₂ – 0,04 та MnSO₄ – 0,001.

Таблиця 4

Синтез лікопіну на мінеральних середовищах штамом 4Lcp

| Середовище | рН | | Кількість СБМ, г/л | Лікопін | |
|----------------------|-------------|-------|-----------------------|--------------|--------------|
| | до | після | | мг/г | г/л |
| | вирощування | | | | |
| Красильнікова СРІ | 7,5 | 5,8 | 2 ± 0,12 | 1,30 ± 0,016 | 2,6 ± 0,10 |
| Чапека з глюкозою | 7,4 | 4,8 | 2 ± 0,95 | 0,5 ± 0,025 | 1 ± 0,13 |
| Глюкозо-аспарагінове | 7,0 | 6,0 | 0,5 ± 0,10 | 0,33 ± 0,049 | 0,165 ± 0,06 |
| Глюкозо-амонійне | 7,4 | 5,5 | 2 ± 0,26 | 0,5 ± 0,023 | 1 ± 0,16 |
| Гліцерино-амонійне | 7,3 | 7,0 | 0,65 ± 0,1 | НВ | НВ |
| Гліцерин – сечовина | 7,0 | 7,5 | 2 ± 0,13 | 0,66 ± 0,038 | 1,32 ± 0,16 |
| Гліцерино-нітратне | 7,0 | 7,2 | 3 ± 0,24 | 1 ± 0,050 | 3 ± 0,28 |
| Гаузе №1 | 7,0 | 7,5 | 2 ± 0,21 | 0,98 ± 0,017 | 1,96 ± 0,14 |
| Крохмально-амонійне | 7,0 | 7,0 | 1,5 ± 0,21 | 0,59 ± 0,042 | 0,9 ± 0,04 |
| Сотона | 7,0 | 9,0 | 2 ± 0,12 | 0,72 ± 0,021 | 1,55 ± 0,03 |

Примітка: * НВ – не визначали.

**ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И АЗОТА НА БИОСИНТЕЗ
ЛИКОПИНА У *STREPTOMYCES GLOBISPORUS 4LCP***

Резюме

Исследовано синтез ликопина штаммом *Streptomyces globisporus 4Lcp* на синтетических питательных средах с разными источниками углерода и азота. Показано, что при выращивании культуры в колбах на качалках наибольший выход ликопина (2,0–3,0 мг/л) наблюдается на среде с глицерином в качестве углеродного субстрата и нитратом натрия или калия в качестве источника азота. Более низкие показатели были получены при использовании глюкозы, крахмала, ацетата натрия и трёхзамещённого цитрата натрия как источников углерода, а так же хлорида и нитрата аммония – как источников азота. Такие субстраты как этанол, сахароза, гидрофосфат и сульфат аммония, мочевины оказались не благоприятными для биосинтеза ликопина исследуемой культурой стрептомицета.

Ключевые слова: *Streptomyces globisporus 4Lcp*, синтетические среды, ликопин.

S. L. Golembiowska, S. G. Tymoshenko, B. P. Matselyukh

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**INFLUENCE OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON BIOSYNTHESIS
OF LYCOPENE BY *STREPTOMYCES GLOBISPORUS 4LCP***

Summary

The biosynthesis of lycopene by the strain *Streptomyces globisporus 4Lcp* has been studied at synthetic media with different sources of carbon and nitrogen. It has been shown that the highest yield of lycopene (2.0 – 3.0 µg/l), in case of cultivation in shaken flasks, has been observed when glycerol is used as a source of carbon and sodium or potassium nitrate as a source of nitrogen. Lower indices have been obtained when glucose, starch, sodium acetate and trisodium citrate are used as sources of carbon and ammonium chloride or ammonium nitrate as a nitrogen source. Such substrates as ethanol, sucrose, ammonium hydrophosphate or sulphate and carbamide have been shown to be inappropriate for lycopene production by the studied strain.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Streptomyces globisporus 4Lcp*, synthetic media, lycopene.

The authors' address: Golembiowska S.L., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Авчиев М.А., Деев С.В., Буторова И.А., Зорина Л.В., Влияние условий культивирования на рост и накопление ликопина парой штаммов гриба *Blakeslea trispora* ВСБ – i 29(-) и 130 (+) // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 76–81.
2. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Теренова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – Москва: Наука, 1983. – 248 с.
3. Голембиовська С.Л., Мацелюх Б.П. Спонтанна та індукована мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів *Streptomyces globisporus* 1912. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 6. – С. 18–23
4. Голембиовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 45–50
5. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-ое изд., перераб. и доп. / Изд-во Московского Университета: Наука, 2004. – С. 70, 72.
6. Кузнецов В.Д. Изучение изменчивости актиномицетов – продуцентов антибиотиков и других биологически активных веществ. // Антибиотики. – 1972. – №7. – С. 666–671.
7. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу (курс лекцій).—К.: НУХТ, 2006.—С. 58–63.
8. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. – М.: Мир, 1978. - С. 134 – 140.
9. Феофилова Е.П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование. // Прикладная биохимия и микробиология – 1994. – 30. – С. 181–196.
10. Basak K., Majumdar S.K. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. // Antimicrob. Agents and Chemotherapy – 1973. – 4, N 1. – P. 6–10.

11. *Cochrane V.W.* The metabolism of species of *Streptomyces* III. The nitrate metabolism of *Streptomyces griseus* // Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1950. – **77**, N 1. – P. 176–180.
12. *Farid M.A., Enshasy H.A., Diwany Al, Sayed S.A.* Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis* // J. Basic Microbiol. – 2000. – **40**, N 3. – P. 157–166.
13. *Jonsbu E., Ellingsen T.E., Nielsen J.* Effect of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. // Tokyo: J. Antibiot. - 2000. - **53**, N 12. - P. 1354–1362.
14. *Majumdar M.K., Majumdar S.K.* Utilization of carbon and nitrogen-containing compounds for neomycin production by *Streptomyces fradiae*. // Folia Microbiologica. – 1971. – **16**, N 4. – P. 285 – 292.
15. *Voelker F., Altaba S.* Nitrogen source governs the patterns of growth and pristnamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. // Microbiology. Physiology and Growth. – 2001. – **147**. – P. 2447 – 2459
16. *Waksman S.A.*. The *Actinomycetes*: Vol II. Classification, identification and description of genera and species. - Baltimore: The Williams and Wilkins Co. – 1961. – 359p.

Отримано 28.09.2009