

Л.В. Авдєєва, К.Є. Борецька, М.А. Хархота, О.О. Нечипуренко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03680, Україна

СИНТЕЗ ПІГМЕНТІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *BACILLUS* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Досліджено пігментсинтезуючу здатність бактерій роду *Bacillus* при культивуванні на різних середовищах. Показано, що найбільш сприятливими для синтезу пігментів було середовище Гаузе 2 та глюкозо-мінеральне середовище. За характером пігментоутворення на середовищі Гаузе 2 всі досліджувані штами бацил були поділені на три групи. Показано, що на синтез пігментів впливають джерела азотного, вуглецевого живлення, амінокислоти та мікроелементи. За основними фізико-хімічними характеристиками пігменти досліджуваних штамів бацил віднесено до каротиноїдів, меланінів та пульхерімінів.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, пігментоутворення, джерела живлення.

Відомо, що синтезувати пігменти здатні мікроорганізми різних систематичних груп. Так, каротиноїди найбільш активно синтезуються бактеріями родів *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* та *Nocardia*. Дріжджоподібні гриби *Candida pulcherrima* відомі, але не єдині продуценти пульхерімінів. Меланін активно синтезують бактерії, зокрема роду *Bacillus*, гриби та актиноміцети [1, 3].

Пігменти мікроорганізмів широко використовують у різних галузях народного господарства. Наприклад, каротиноїди, зокрема β -каротин, є широко вживаною біодобавкою та провітамінном А, та є високоактивним антиоксидантом [1, 3]. Пігменти меланінового ряду використовуються у медицині, харчовій та косметичній промисловостях.

Одним із найбільш ефективних та економічно обґрунтованих методів отримання пігментів є мікробіологічний синтез. Він має багато переваг над хімічним. Саме тому актуальним завданням сучасної мікробіології та біотехнології є скринінг серед існуючих або створення нових штамів продуцентів пігментів різних класів.

Відомо, що деякі аеробні споротвірні бацили, наприклад, *Bacillus megaterium*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus indicus*, *Bacillus cibi*, *Bacillus vedderi*, *Bacillus jeotgali*, *Bacillus okuhidensis*, *Bacillus clarkii*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus firmus* здатні продукувати пігменти, насамперед каротиноїди або меланіни [1]. Завдяки своїй непатогенності і технологічності культивування бактерії роду *Bacillus* є перспективними продуцентами цих біологічно-активних сполук.

Відомо також, що на ріст та продукування вторинних метаболітів мікроорганізмів значною мірою впливають джерела вуглецевого, азотного живлення та деякі іони металів [3]. Але досить часто на середовищах, що забезпечують найкращий ріст певних штамів бацил, не відмічається високого рівня пігментоутворення [4].

Метою нашої роботи було дослідження впливу різних джерел живлення на біосинтез пігментів бактеріями роду *Bacillus* та підбір середовища, найбільш придатного для прояву їх пігментсинтезуючої активності.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були 19 штамів бактерій роду *Bacillus* з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, здатних до синтезу пігментів (результати попереднього скринінгу не наведені).

Для визначення середовища, найбільш сприятливого для утворення бацилами пігментів, було вивчено пігментсинтезуючу здатність досліджуваних штамів бацил *Bacillus* на наступних середовищах: м'ясо-пептонному агарі (МПА), сусло-агарі (СА), лактобак-агарі (ЛБА), Гаузе №2 та глюкозо-мінеральному середовищі такого складу (г/л): натрія цитрат – 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75, KH_2PO_4 – 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18, глюкоза – 10-15, рН середовища – 7,0 \pm 0,2.

Дослідження впливу різних джерел вуглецевого і азотного живлення, іонів деяких металів, а також амінокислот на інтенсивність синтезу бацилами пігментів проводили шляхом додавання їх до базового середовища. Дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон, соєве борошно, соєвий концентрат та зелену патоку вносили в середовище культивування в

кількості 1 %. При оцінці ролі джерел вуглецевого живлення на пігментсинтезуючу здатність бактерій роду *Bacillus* глюкозу замінювали на відповідну кількість рафінози, манітолу, лактози, мальтози, сахарози, арабінози, дульцитолу. Також було досліджено вплив двох концентрацій глюкози (1 та 2 %) на інтенсивність біосинтезу пігментів штамми бацил.

У всіх варіантах дослідів штами бацил культивували при 37 °С протягом 72 годин. Пігментоутворення оцінювали порівняно з контрольним мінерально-глюкозним середовищем за 4-бальною системою.

Каротиноїдні пігменти екстрагували метанолом згідно з методикою [4], меланінові пігменти – кислото-лужною екстракцією, пульхерімінові – загальноприйнятою методикою [6]. Спектри поглинання реєстрували на Spigcord 11 при довжинах хвиль 210-700 нм.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що досліджувані штами бацил росли на всіх досліджуваних поживних середовищах. Проте, найбільш сприятливими для прояву їх пігментсинтезуючої активності було середовище Гаузе №2. На цьому середовищі відмічали високий рівень прояву пігментсинтезуючої здатності досліджуваних штамів бацил порівняно з культивуванням на інших поживних середовищах (табл. 1). Найнижчий рівень пігментоутворення було виявлено при використанні у ролі поживного середовища МПА.

Таблиця 1

Пігментсинтезуюча здатність бактерій роду *Bacillus* на різних поживних середовищах

№	Штам	Середовище культивування		
		МПА	Глюкозо-мінеральне середовище	Гаузе 2
Група 1а				
1.	<i>B. subtilis</i> 5112	Рожево-білий	Блідо-оранжевий	Оранжевий з світлим краєм
2.	<i>B. subtilis</i> 5113	Блідо-оранжевий	Яскраво-оранжевий	Червоно-оранжевий
3.	<i>B. subtilis</i> v. <i>niger</i> B-910	Блідо-оранжевий	Яскраво-оранжевий	Яскраво-оранжевий
4.	<i>B. mesentericus flavus</i>	Безбарвний	Блідо-оранжевий	Рожево-оранжевий
5.	<i>B. spp. M</i>	Блідо-оранжевий	Оранжевий	Червоно-оранжевий
Група 1б				
6.	<i>B. subtilis</i> 3ЛГ	Брудно-білий	Рожево-білий	Червоно-коричневий
7.	<i>B. subtilis</i> 24ЛГ	Брудно-білий	Рожево-білий	Червоно-коричневий
8.	<i>B. licheniformis</i> A 6/2	Брудно-білий	Блідо-коричневий	Червоно-коричневий
9.	<i>B. licheniformis</i> A 6/3	Брудно-білий	Рожево-білий	Червоно-коричневий
10.	<i>B. subtilis</i> MC 6 ₁	Прозорий з білим краєм	Блідо-коричневий	Червоно-коричневий
11.	<i>B. subtilis</i> 138(3)-2	Брудно-білий	Блідо-коричневий	Червоно-коричневий
12.	<i>B. subtilis</i> 5014	Блідо-оранжевий	Оранжевий	Червоно-коричневий
Група 2а				
13.	<i>B. mesentericus niger</i> 236	Брудно-білий	Брудно-білий	Сірий
14.	<i>B. subtilis</i> 23/2	Брудно-білий	Брудно-білий	Сірий
15.	<i>B. subtilis</i> 24 D	Брудно-білий	Брудно-білий	Брудно-білий
16.	<i>B. subtilis</i> 24D ₂	Брудно-білий	Брудно-білий	Сірий
Група 2б				
17.	<i>B. subtilis</i> var <i>atter.</i> ВКМ -761	Безбарвний	Чорний	Чорний
18.	<i>B. subtilis</i> var <i>atter.</i> ССМ877	Безбарвний	Чорний	Чорний
Група 3				
19.	<i>B. subtilis</i> 5127	Світло-жовтий	Лимонно-жовтий	Лимонно-жовтий

Незважаючи на інтенсивне утворення пігментів на середовищі Гаузе 2, останнє через свій не точно визначений склад мало придатне для використання в подальших дослідях із впливу джерел живлення на пігментсинтезуючу здатність бацил. Тому надалі застосовували глюкозо-мінеральне середовище, при використанні якого були одержані результати, найбільш близькі до таких на середовищі Гаузе 2.

За кольором та інтенсивністю пігментоутворення при рості на середовищі Гаузе 2 та глюкозо-мінеральному середовищі, досліджувані штами бацил були умовно поділені на 3 групи (табл. 2). До першої групи віднесли 12 штамів. Всі вони утворювали пігменти червоного кольору різних відтінків та інтенсивності. Штами підгрупи 1а утворювали яскраво-червоні пігменти, що не дифундували в поживне середовище, підгрупи 1б – продукували внутрішньо- та позаклітинні пігменти червоно-коричневого кольору. До другої групи, що, в свою чергу, складалася також із двох підгруп, віднесли штами, здатні до синтезу пігментів чорного та сірого кольорів. Штами підгрупи 2а синтезували внутрішньоклітинні пігменти сірого кольору, підгрупи 2б – як внутрішньо-, так і позаклітинні пігменти чорного кольору. До 3 групи було віднесено 1 штама, що продукував яскраво-лимонний внутрішньо- та позаклітинний пігмент.

Слід відзначити, що при вирощуванні на МПА та СА лише штами підгрупи 1а та 3 групи проявляли здатність до синтезу пігментів, всі інші штами залишалися безбарвними.

Таблиця 2

Вплив джерел азотного, вуглецевого, мінерального живлення на пігментсинтезуючу здатність бацил

Компонент середовища	Група 1		Група 2		Група 3
	Підгрупа а	Підгрупа б	Підгрупа а	Підгрупа б	
Дріжджовий автолізат	0	0	+	+	0
Дріжджовий екстракт	0	0	0	0	0
Пептон	0	0	0	0	0
Соеве борошно	0	0	+	+	0
Сосвий концентрат	0	0	+	+	0
Зелена патока	0	0	0	0	0
MnSO ₄	0	+	+	+	0
MgSO ₄	0	+	0	0	0
ZnSO ₄	0	+	+	+	0
K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄	0	0	0	0	0
FeSO ₄	0	Rb*	+	+	-
Li	0	0	0	0	0
Na ₂ MoO ₄	0	E**	E**	0	--
KCl	0	0	0	0	-
Ca	0	0	0	---	---
рафіноза	----	0	0	0	---
маніт	0	0	+	0	0
Лактоза	----	0	0	0	---
Мальтоза	0	0	0	0	0
Сахароза	0	0	0	0	0
Глюкоза 2%	0	0	0	0	
Арабіноза	0	0	0	0	0
дульцит	0	0	0	0	0
Цистеїн	0	0	0	0	0*
Тирозин	0	0	0	0	0
Валін	0	0	0	0	-
Триптофан	0	0	0	0	0*
Фенілаланін	0	0	0	0	0*
Пролін	0	0	0	0	----
Метионін	0	0	0	0	0*
Глутамінова кислота	0	0	0	0	0*

Примітка: Rb – колонії червоно-коричневого кольору; E** – позаклітинний пігмент жовтого кольору, 0* – втрата позаклітинного пігменту за наявності внутрішньоклітинного.

Встановлено, що пігментсинтезуюча здатність штамів підгруп 1а, 1б та 3 групи не залежала від досліджуваних джерел органічного азотного живлення. Ступінь пігментації штамів групи 2 збільшувалася за наявності у складі базового середовища дріжджового автолізату, соєвого концентрату та зеленої патоки. Не вдалося досягти стимуляції пігментоутворення у штамів підгрупи 1а шляхом зміни вмісту солей у складі середовища. Інтенсивність забарвлення у штамів підгрупи 1б підвищувалась за наявності у складі середовища MnSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , а за наявності FeSO_4 колонії забарвлювалися у коричнево-червоний колір. У штамів підгруп 1б та 2а за наявності Na_2MoO_4 в середовищі культивування навколо колоній з'являлося жовте забарвлення.

Показано, що у штамів підгруп 1б, 2а та 2б пігментоутворення не залежить від джерел вуглецевого живлення, а у штамів підгрупи 1а та 3 групи пігментоутворення було майже відсутнє при вирощуванні їх на середовищах із рафінозою та лактозою.

Штами підгруп 1а, 1б, 2а та 2б не змінювали свою пігментсинтезуючу здатність за наявності амінокислот, штам групи 3 за наявності амінокислот втрачав позаклітинні пігменти, а за наявності проліну – взагалі не проявляв здатності до синтезу пігментів.

На підставі наведених даних було припущено, що штами підгрупи 1а та 3 групи є продуцентами каротиноїдів, штами підгрупи 1б – пульхеримінів; штами підгруп 2а та 2б – пігментів меланінової природи.

Для підтвердження такого припущення було отримано спектри поглинання екстрагованих пігментів представників кожної з груп, адже відомо, що спектри поглинання є важливою характеристикою пігментів, що може бути використана для їх попередньої ідентифікації. Встановлено, що метанольні екстракти пігментів штамів підгрупи 1а мають три максимуми поглинання в видимій області при 360–370, 390–410 та 410–430 нм (рисунок). Форма піків була характерною для каротиноїдних пігментів, проте відзначалося значне зміщення максимумів поглинання вліво, порівняно з відповідними показниками, що описані в літературі для каротиноїдів [4]. Таке зміщення, ймовірно, можна пояснити тим, що каротини в отриманих нами екстрактах можуть знаходитись або в окисненому вигляді та/або в трансформі. Не виключено також, що нами було отримано спектри поглинання проміжних продуктів каротиногенезу. Найбільш близькими спектри поглинання екстрактів досліджуваних штамів були до спектра ауроксантину (продукту епоксилування каротину). Можливо, що екстраговані пігменти досліджуваних штамів бацил знаходяться не у вільному вигляді, а у комплексах із вуглеводами, ліпідами, білками. Таке припущення підтверджується тим, що позаклітинний пігмент штаму *B. subtilis* 5127 мав спектр поглинання, характерний для каротиноїдів, та одночасно висолувався при додаванні сульфату амонію та давав позитивну реакцію на білок. Можливо саме цим пояснюється його розчинність у воді.

Пульхеримін – пігмент, який окрім дріжджів притаманний також *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *B. subtilis*. Так само як і у дріжджів, утворення червоного пігменту у бацил спостерігали тільки на середовищах, що містять достатню кількість заліза. Для *B. cereus* var. *alesti* було встановлено, що максимальне утворення пігменту спостерігали за умов додавання 0,01 % $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [4]. В наших дослідях стимуляція пігментоутворення у бацил відбувалася за наявності 0,01 % FeSO_4 у середовищі культивування.

Відомі два різні погляди на біологічну роль пульхериміну в бактеріальній клітині. Згідно з першим, цей пігмент бере участь у функціонуванні електрон-транспортного ланцюга. Інший погляд повністю заперечує його роль у життєдіяльності мікроорганізмів. Припускають, що пульхерімінова кислота вступає в неензиматичну реакцію із залізом у навколишньому середовищі з утворенням пульхериміну. Ця реакція протікає позаклітинно, без участі ферментів, оскільки додавання сполук, що інгібують утворення білків, не впливає на синтез цього пігменту. Тому вважається, що утворення пульхериміну є скоріше вторинним процесом, що практично не впливає на метаболізм продуцента [5].

Відомо, що завдяки змінній валентності залізо відіграє важливу роль у транспорті електронів. Враховуючи лабільність дихальних шляхів мікроорганізмів, не слід заперечувати припущення про те, що в визначених умовах пульхеримін може брати участь у транспорті електронів. Ймовірно, деякі залізовмісні пігменти, зокрема пульхеримін, можуть захищати мікроорганізми від УФ-опромінення, при цьому здатність до виживання пігментованих клі-

тин у два рази вища, ніж позбавлених пульхеріміну. Є також дані, що пульхерімінові кислоти характеризуються неспецифічною антифунгальною активністю [4].

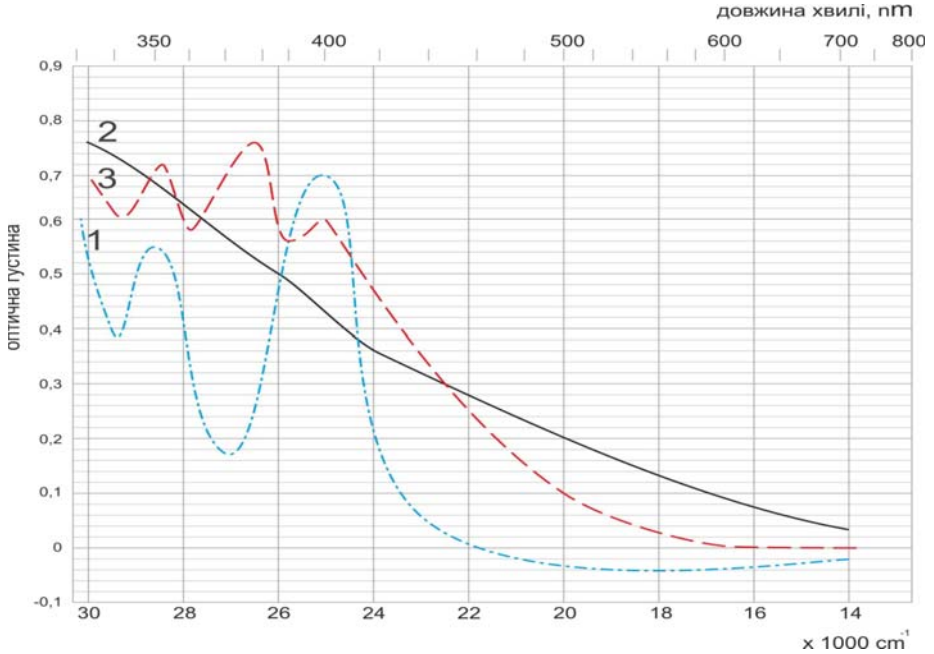


Рисунок. Спектри поглинання пульхерімінових (1), меланінових (2) та каротиноїдних (3) пігментів бацил.

Під час екстрагування меланіну у досліджуваних культур було отримано 4 фракції: кисло-, спирто- та ацетонорозчинну, а також лугорозчинну, яку, за даними літератури, можна віднести до істинних меланінів [6]. Спектри поглинання меланінових пігментів досліджуваних штамів бацил мали вигляд прямої похилої лінії в межах 400–600 нм. Отримані меланоїдні пігменти були розчинні в сильних лугах та нерозчинні в кислотах, воді, спирті, ацетоні та інших розчинниках. Отже, за сукупністю даних щодо розчинності та спектрів поглинання цих пігментів, їх можна віднести до меланінів.

Таким чином, нами встановлено, що для виявлення пігментсинтезуючої здатності бацил найбільш придатне середовище Гаузе 2, для дослідження закономірностей їх біосинтезу – глюкозо-мінеральне середовище. Показано, що бактерії роду *Bacillus* здатні до синтезу пігментів каротиноїдної, меланоїдної та пульхерімінової природи. Видової специфічності в синтезі тих чи інших груп пігментів штамми бацил нами не було встановлено, також не було відмічено одночасного синтезу пігментів різних типів.

Л.В. Авдеева, К.Е. Борецкая, М.А. Хархота, О.О. Нечипуренко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

СИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Резюме

Исследована пигментсинтезирующая способность бактерий рода *Bacillus* при культивировании на различных средах. Установлено, что наиболее благоприятными для пигментообразования были среды Гаузе 2 и глюкозо-минеральная среда. По характеру пигментообразования на среде Гаузе 2 все исследованные штаммы были разделены на три группы. Показано, что на синтез пигментов могут влиять источники азотного, углеводного питания, аминокислоты и микроэлементы. Установлено, что исследуемые штаммы бацилл способны продуцировать каротиноиды, меланины и пульхеримины.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, пигментообразование, источники питания.

**SYNTHESIS OF PIGMENTS BY BACTERIA OF *BACILLUS* GENUS
AT GROWING ON DIFFERENT NUTRITION MEDIA**

S u m m a r y

The ability of *Bacillus* strains to produce pigments under their growing on different nutrient media has been investigated. Gause 2 medium and glucose-mineral medium were the most favorable ones for pigments synthesis. All investigated strains were divided into three groups based on the features of pigment formation under their growing on the Gause 2 medium. It has been shown that the sources of nitrogen, carbon, amino acids and trace elements in the medium greatly affected the production of pigments. It was found that the investigated *Bacillus* strains were able to produce carotenoids, melanins and pulherrimins.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д : bacteria of genus *Bacillus*, pigments synthesis, nutrition sources.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s : *Avdeeva L.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Дейнека В.И., Шапошников А.А., Дейнека Л.А. Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения // Научные ведомости. – 2008. – № 6. – С. 19–25.
2. Кулаковская Е. В. Антифунгальные целлобиозолипиды дрожжевых грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» – Пушино, 2006. – С. 9–15.
3. Лях С. П. Микробный меланиногенез. – Москва: Наука, 1998. – С. 6–12.
4. Феофилова Е. П. Пигменты микроорганизмов. – Москва: Наука, 1974. – С. 143.
5. Cryle M.J., Bell S.G., Schlichting I. Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: a cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide oxidase // Biochemistry. – 2010. – 49 (34). –P. 7282–7296.
6. Delia B. Rodriguez-Amaya, Mieko Kimura. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. – Washington: HarvestPlus Technical Monograph. – 2004. – P. 58.

Отримано 20.01.2014