

Н. І. Корецька, М. В. Пристай, О. В. Карпенко
Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ
ім. Л. М. Литвиненка НАН України

БІОСИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ШТАМУ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS AU-1*

© Корецька Н. І., Пристай М. В., Карпенко О. В., 2014

Встановлено, що штам *R. erythropolis* Au-1 синтезує клітинно-зв'язані трегалозоліпіди (0,4-2,9 г/л) та екзополісахариди (1,6-8,3 г/л) під час росту на поживних середовищах із різними джерелами вуглецю.

Показано, що за передпосівного оброблення насіння продуктами синтезу цього штаму морфометричні параметри проростків пшениці, ріпаку та суріпиці, зокрема під час росту на забрудненому нафтою середовищі, зростали на 8,0 – 110,9 %.

Ключові слова: *Rhodococcus*, трегалозоліпіди, екзополісахариди, передпосівне оброблення насіння.

It was established that strain *R. erythropolis* Au-1 synthesizes cell-associated trehalose lipids (0.4-2.9 g/l) and exopolysaccharides (1.6-8.3 g/l) during the growth on nutrient medium with different carbon sources.

After pre-sowing treatment of seed by products of this strain morphometric parameters of wheat, rape and coleseed seedlings, including during the growth on oil-polluted environment were increased on 8.0-110.9 %.

Key words: *Rhodococcus*, trehalose lipids, exopolysaccharides, pre-sowing treatment of seeds

Вступ. В останні десятиліття біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР, біосурфактанти) інтенсивно досліджуються як потенційні замітники синтетичних ПАР. Хоча сьогодні висока вартість обмежує виробництво біоПАР, але їхні властивості, зокрема, низька токсичність, біодеградабельність, екологічна безпечність, можливість синтезу з дешевих субстратів створює перспективу їх застосування у різних галузях промисловості та сільського господарства. У зв'язку з цим актуальною проблемою є пошук активних штамів-продуцентів та розроблення ефективних технологій мікробних ПАР. На нашу думку, на увагу заслуговують бактерії роду *Rhodococcus*, що синтезують трегалозоліпіди та інші поверхнево-активні метаболіти. Проводяться дослідження, спрямовані на отримання ефективних та доступних препаратів біосурфактантів. У літературі присутні дані про культивування бактерій роду *Rhodococcus* на субстратах – відходах харчової промисловості, зокрема, ріпаковій та пережареній соняшниковій оліях [1]. Зроблені спроби збільшити вихід ПАР за рахунок внесення до поживного середовища попередників біосинтезу гліколіпідів – фумарату та цитрату [2]. Проте питання оптимізації технологій біосурфактантів не є вирішеним.

Зокрема ми звернули увагу на можливість використання біоПАР у рослинництві. Наявні літературні дані дозволяють припустити, що продукти біосинтезу бактерій роду *Rhodococcus* повинні стимулювати ріст та розвиток рослин [3], покращувати поглинання мінеральних елементів рослинами [4] та можуть мати здатність підвищувати стійкість рослин до стресових умов та фітопатогенів [5]. Наведені дані вказують на актуальність розроблення ефективних препаратів на основі метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* та пошуку нових сфер їх застосування, зокрема у рослинництві.

Матеріали і методи. Об'єкт досліджень – штам *Rhodococcus erythropolis* Au-1 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 ротатійній качалці (220 об/хв) за температури 30⁰С упродовж 5 діб. Застосовували поживне середовище такого складу (г/л): джерело вуглецю – 20,0; CO(NH₂)₂ – 1,5; дріжджовий екстракт – 1,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5; цитрат натрію – 1,0 (рН 6,8-7,0). Біомасу клітин визначали гравіметричним методом [6].

Ліпіди отримували методом екстракції з клітинної маси сумішшю Фолча (хлороформ: метанол – 2:1) [7] з подальшим випарюванням у вакуумі. Кількість ліпідів визначали гравіметричним методом.

Із культуральної рідини клітини відділяли шляхом центрифугування при 6000g протягом 15 хв. Екзополісахариди (ЕП) виділяли осадженням із супернатанту культуральної рідини (СКР) при додаванні 2 об'ємів етилового спирту з подальшим переосадженням та висушуванням осаду за температури 80⁰С до постійної маси [8]. Інший метод – осадження у кислому середовищі при рН 3. Вміст полісахаридів визначали гравіметричним методом.

Поверхневий натяг СКР визначали за методом Дю-Нуї [9] на тензіометрі KRÜSS K6 (“KRÜSS” GmbH, Germany).

Для визначення емульгувальної активності 10 мл СКР перемішували з 10 мл вазелінової оливи впродовж 2 хв., суміш переносили у вимірювальну пробірку NS-14, індекс емульгування (E₂₄) визначали через 24 год. як відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини у пробірці [10].

Якісний аналіз ліпідів проводили за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках Sorbifil ПТСХ-АФ-А-УФ (ЗАО Сорбполимер, Росія). Рухома фаза [11]: хлороформ-метанол-вода 65:15:2. Ідентифікацію ліпідів проводили візуалізацією пластинок за допомогою специфічних реагентів:

Для визначення впливу отриманих метаболітів на рослини використовували насіння пшениці озимої, ріпаку озимого та суріпиці. Відібране насіння замочували на 1 год. у розчинах досліджуваних речовин (ліпіди – за концентрації 0,01; 0,02; 0,05 г/л, екзополісахариди – 0,05 г/л), контроль – дистильована вода. У чашки Петрі на зволожений фільтрувальний папір розкладали по 20 (пшениця) та 50 (суріпиця, ріпак) оброблених насінин та поміщали у термостат (20⁰С). Повторність трикратна. Додатково проводили досліди на нафтових забрудненнях середовища для росту рослин (вміст нафти – 2 %). На 7-му добу визначали лабораторну схожість насіння [12] та морфометричні показники проростків.

Результати і обговорення. Досліджено ріст та синтез біоПАР штамом *R. erythropolis* Au-1 на поживних середовищах із різними джерелами вуглецю (табл. 1). Встановлено, що цей штам добре засвоює всі досліджувані субстрати, синтезує клітинно-зв'язані поверхнево-активні ліпіди та екзополісахариди. Найефективніше ЕП продукуються під час росту штаму на соняшниковій олії (індекс емульгування супернатанту становить 67,8 %). Клітинно-зв'язані ПАР ефективно синтезуються під час використання водонерозчинних субстратів, зокрема гексадекану (2,80 г/л), тетрадекану (2,73 г/л) та оливкової олії (2,90 г/л).

Таблиця 1

Ріст та синтез біоПАР штамом *R. erythropolis* Au-1 на поживному середовищі з різними джерелами вуглецю

Джерела вуглецю	Абсолютно суха біомаса, г/л	Клітинно-зв'язані ПАР, г/л	Поверхневий натяг СКР, мН/м	Емульгувальна активність СКР E ₂₄ ,%
1	2	3	4	5
Сахароза	9,40±0,5	0,78±0,05	53,0±0,6	45,0±0,6
Гліцерин	9,34±0,38	0,38±0,03	50,5±0,5	45,2±0,4

1	2	3	4	5
Фуз олійний	10,21±0,46	2,62±0,12	45,5±0,3	36,6±0,7
Олія соняшникова	9,82±0,44	1,73±0,10	33,8±0,2	67,8±1,1
Вазелінова олива	10,16±0,37	3,48±0,14	32,4±0,2	28,2±0,6
Оливкова олія	12,74±0,57	2,90±0,12	46,0±0,3	15,0±0,1
Тетрадекан	11,50±0,62	2,73±0,13	31,1±0,3	20,2±0,4
Гексадекан	10,34±0,53	2,80±0,13	33,2±0,2	24,3±0,6

За допомогою методу тонкошарової хроматографії із застосуванням специфічних реагентів визначено, що до клітинно-зв'язаних поверхнево-активних ліпідів штаму *R. erythropolis* Au-1 входять: трегалозоефіри жирних кислот, трегалозо-6-міколати, трегалозо-6,6'-диацилати, трегалозо-6,6'-диміколати, міколати, а також жирні кислоти (рис. 1). Виявлено, що склад цих біоПАР залежить від джерела вуглецю, що входить до поживного середовища. Так, під час використання оливкової олії спостерігався синтез не лише гліколіпідів (трегалозоміколатів та трегалозодиміколатів), а й тригліцеридів, 3-кето-2-алкіл жирних кислот, жирних спиртів.

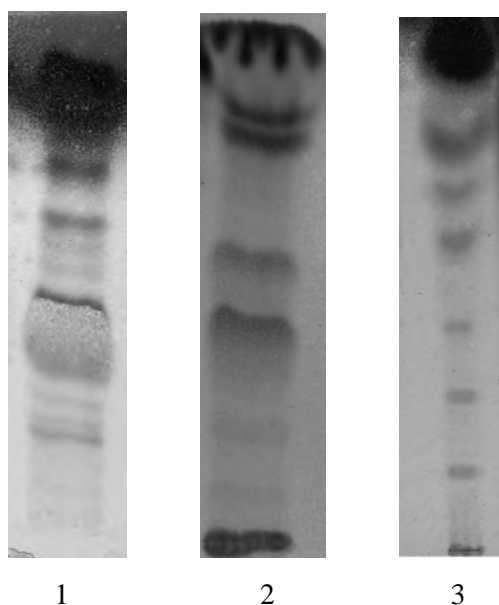


Рис. 1. Тонкошарові хроматограми загальних ліпідів (1, 3) і гліколіпідів (2) *R. erythropolis* Au-1
Джерело вуглецю – гексадекан (1, 2) та оливкова олія (3)

Штам *R. erythropolis* Au-1 продукує екзополісахариди, які мають емульгувальні властивості. Для виділення ЕП використовували такі методи: осаджували підкисленням СКР до рН 3 та додаванням двох об'ємів етанолу; СКР прогрівали на киплячій водяній бані впродовж однієї години, а потім осаджували емульгатори. Досліджено залежність кількості емульгатора від методу його виділення.

Таблиця 2

Вплив методу виділення на кількість емульгатора штаму *R. erythropolis* Au-1

Спосіб одержання емульгатора	Вміст емульгатора в СКР, г/л	
	Без обробки СКР	Після термічної обробки СКР
Осадження етанолом	1,55±0,08	7,18±0,38
Осадження при рН=3	3,78±0,18	8,27±0,43

Встановлено, що осадження ЕП за допомогою підкислення середовища є ефективнішим, а також дешевшим методом. Крім того, термічна обробка дає можливість значно збільшити кількість виділеного ЕП, ймовірно, за рахунок вилучення капсульних полісахаридів.

Досліджували поверхнево-активні та емульгувальні властивості супернатанту та культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1, вирощеного на поживних середовищах з різними джерелами вуглецю, після стерилізації (1,1 атм протягом 20 хв). Дані подані у табл. 3.

Таблиця 3

Емульгувальна та поверхнева активність супернатанту та культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1

Джерела вуглецю	Емульгувальна активність E ₂₄ , %		Поверхневий натяг, мН/м	
	КР	СКР	КР	СКР
Сахароза	95	30	53,2	44,9
	97*	42*	51,2*	42,4*
Гексадекан	20	3	32,1	30,2
	65*	43*	31,3*	29,9*
Тетрадекан	23	2	33,5	30,8
	58*	28*	31,2*	30,1*

КР автоклали при р 1,1 атм.

Встановлено, що після стерилізації поверхнево-активні властивості СКР та КР штаму *R. erythropolis* Au-1 зберігаються, а емульгувальна активність дещо покращується, що свідчить про додаткове вивільнення з клітин капсульних полісахаридів.

Проведено дослідження, спрямовані на вивчення перспективи використання продуктів синтезу штаму *R. erythropolis* Au-1 в агротехнологіях. Зокрема, вивчено вплив передпосівного оброблення насіння пшениці розчинами клітинно-зв'язаних ліпідів (ТЛ) та екзополісахаридів (ЕП) на морфометричні показники проростків. У експериментах використовували розчини ТЛ та ЕП за концентрації 0,05 г/л.

Встановлено, що оброблення насіння розчинами ЕП та ТЛ стимулює ріст проростків пшениці. Дані наведено на рис. 2, 3. Зокрема, схожість насіння збільшувалась на 10–12,5 % залежно від використаного препарату. Спостерігався приріст довжини пагона та кореня відповідно на 9,0–9,5 % та 12,9–15,0 % відносно контролю; маса пагона і кореня збільшувалась на 8,0–18,0 % та 10–35,8 %.

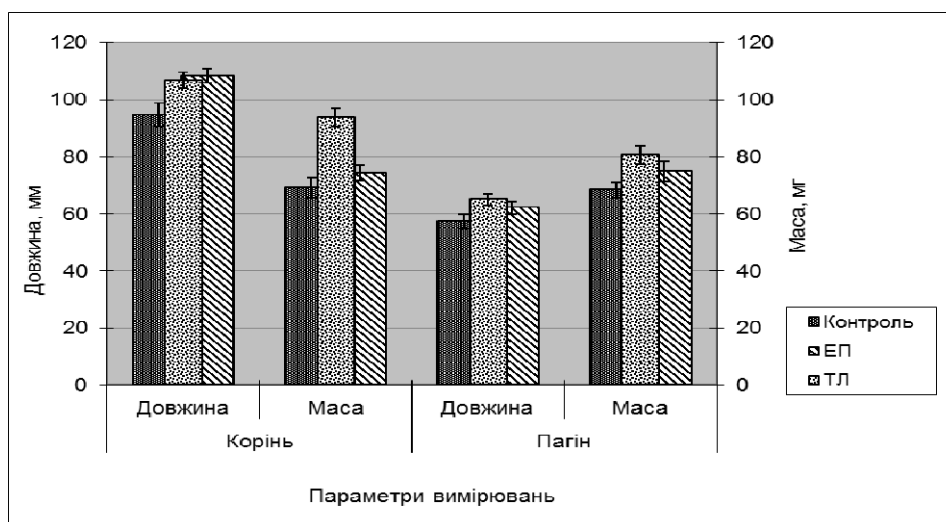


Рис. 2. Вплив екзополісахаридів та трегалозоліпідів на морфометричні параметри проростків пшениці. Примітки: ЕП – розчин екзополісахаридів, 0,05 г/л; ТЛ – розчин трегалозоліпідів, 0,05 г/л

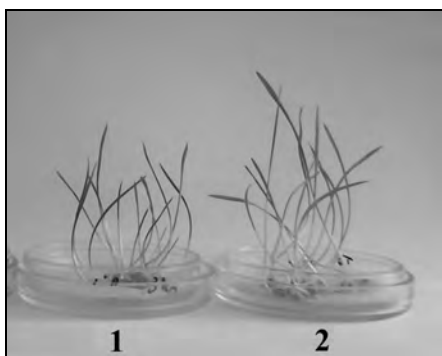


Рис. 3. Проростки пшениці за передпосівного оброблення насіння розчином ТЛ (2). Контроль – дистильована вода (1)

Досліджено вплив передпосівного оброблення насіння синтетичними поверхнево-активними речовинами та біоПАР (Твін 80, розчини ТЛ за концентрацій 0,01; 0,02 та 0,05 г/л) на схожість та біометричні показники ріпаку озимого та суріпиці під час росту рослин на нафтових забрудненнях (2 %). Дані подано на рис. 4.

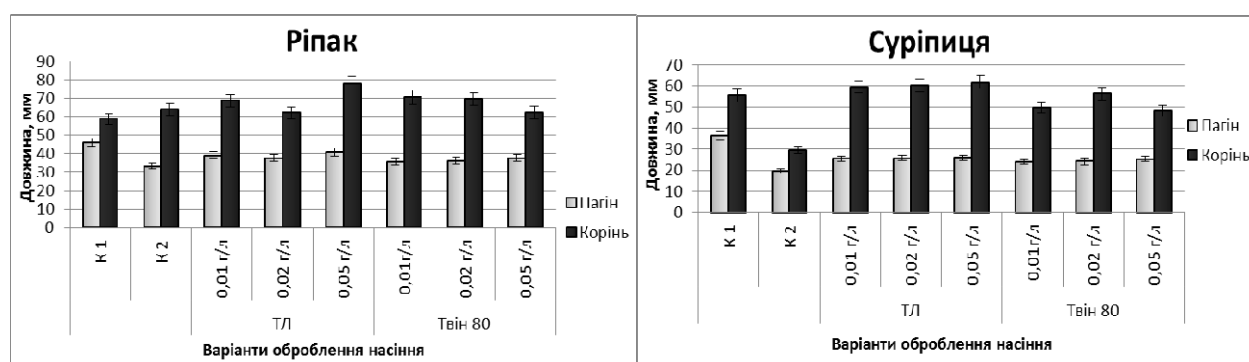


Рис. 4. Вплив оброблення насіння ріпаку та суріпиці розчинами ПАР (ТЛ, Твін 80) на біометричні показники проростків за проростання на нафтових забрудненнях.

Примітки: 1. К 1 – контроль без нафти; К 2 – контроль з нафтою. 2. ТЛ – розчин трегалозоліпідів

Встановлено, що за всіх варіантів оброблення схожість насіння ріпаку озимого практично не змінювалась. Біометричні показники проростків були на рівні контролю або більшими. Найкращий ефект показало оброблення насіння трегалозоліпідами за концентрації 0,05 г/л – довжина пагона зростає на 22,5 %, а кореня – на 22,2 %. Оброблення насіння суріпиці всіма досліджуваними ПАР позитивно впливає як на схожість насіння, так і на біометричні показники проростків. Найкращим варіантом було застосування трегалозоліпідів за концентрації 0,05 мг/л. При цьому довжина пагона та кореня збільшувалась на 32,1 % та 110,9 % відповідно, а схожість насіння – на 26,3 % відносно контролю.

Висновки. 1. Встановлено, що штам *R. erythropolis* Au-1 активно синтезує клітинно-зв'язані поверхнево-активні ліпіди під час росту на поживних середовищах із водонерозчинними джерелами вуглецю. Зокрема, при використанні гексадекану, тетрадекану та оливкової олії продукується 2,7–2,9 г/л клітинно-зв'язаних ПАР.

2. Визначено, що до складу поверхнево-активних ліпідів штаму *R. erythropolis* Au-1 (джерело вуглецю – гексадекан) входять трегалозоефіри жирних кислот, трегалозо-6-міколати, трегалозо-6,6'-диацилати, трегалозо-6,6'-диміколати, міколати, а також жирні кислоти. Виявлено, що склад клітинно-зв'язаних ліпідів залежить від джерела вуглецю, що входить до поживного середовища. Так, при використанні оливкової олії спостерігався синтез не лише гліколіпідів (трегалозоміколатів та трегалозодиміколатів), а й тригліцеридів, жирних спиртів та значної кількості жирних кислот.

3. Досліджено, що підкислення СКР до рН=3 є ефективнішим та дешевшим способом одержання екзополісахаридів штаму *R. erythropolis* Au-1, ніж осадження спиртом (вихід ЕП

становив відповідно 1,55 г/л та 3,78 г/л), причому під час термічної обробки КР ефективність обох методів значно покращувалась (відповідно вихід ЕП становив 7,18 г/л та 8,27 г/л).

5. Показано можливість використання продуктів синтезу бактерій штаму *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві:

1) передпосівне оброблення насіння розчинами ТЛ та ЕП за концентрації 0,05 г/л сприяє підвищенню показників схожості та морфометричних параметрів проростків пшениці (приріст маси та довжини кореня і пагона становив 8,0 – 35,8 %, а схожості насіння – 10 – 12,5 %);

2) при вирощуванні ріпаку та суріпиці на середовищі з нафтовими забрудненнями за передпосівного оброблення насіння розчинами ТЛ (0,05 г/л) морфометричні параметри проростків зростали на 22,2 – 110,9 % залежно від виду рослин.

1. Makkar R.S, Cameotra S.S, Banat I.M *Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production* // *AMB Express* – 2011. – 1:5. 2. Пуроз Т. П., Шевчук Т. А., Клименко Ю. О. *Особливості синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів Rhodococcus erythropolis EK-1* // *Мікробіол. журн.* – 2010. – Т. 72. – № 2. – С.10–15. 3. *Biosurfactants in agriculture* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 February; 97 (3): 1005 – 1016. 4. Корецька Н. І., Карпенко О. В., Баранов В. І. *Вплив препарату трегалозоліпідів на поглинання калію та кальцію проростками сої та пшениці* // *Матеріали наукової конференції “Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку”, 12-15 вересня 2013 р.* – Львів: Сполом – С.38. 5. Підгорський В. С., Коваленко О. Г., Васильєв В. М., Ісакова О. В. *Використання кормових та пекарських дріжджів для отримання біологічно активних гліканів* // *Біотехнологія.* – 2010. – Т.3, № 6. – С.49–58. 6. *Методы общей бактериологии* / [под ред. Ф. Герхардта и др.] – М.: Мир, 1983. Т.1. – 535 с. 7. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues* // *J. of Biological Chemistry.* – 1957. – № 226. – P. 497–509. 8. Williams A. G., Wimpenny Y. W. *Exopolysaccharide production by Pseudomonas NCIB 11264 grown in bat culture* // *Journal of Biological Chemistry.* – 1977. – Vol.102. – P.12 – 21. 9. Ni, Q. Chen, H. Ruan *Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by Phaffia rhodozyma* // *Journal of Zhejiang University Science.* – 2007. – Vol.8, № 5. – P.365 – 370. 10. 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. – № 8. – С.49–53. 11. Kretschmer A. *Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from Rhodococcus erythropolis grown on n-alkanes* / A. Kretschmer, H. Bock, F. Wagner // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1983. – Vol.41, № 4. – P.864 – 870. 12. ДСТУ 4138-2002. *Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004-01-01.* Київ. *Держспоживстандарт України.* – 2003. – 173 с.