



## ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ НА СИНТЕЗ КАРОТИНОЇДІВ

Е.Р. Костенко<sup>1</sup>, О.Ю. Бондаренко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Київський Палац дітей та юнацтва

вул. Івана Мазепи, 13, Київ, 01010, Україна

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03122, Україна

**e-mail:** kostenkoerika21@gmail.com

Каротини - природні органічні пігменти групи каротиноїдів, які є попередниками вітаміну А. Цей вітамін виконує ряд важливих функцій в організмі людини. У продуктах тваринного походження міститься в усіх формах, проте оскільки чистий ретинол нестабільний, значно його частина перебуває у вигляді складних ефірів ретинолу [1]. Вітамін не може синтезуватися в організмі людини самостійно. Його нестача в організмі провокує ряд проблем зі здоров'ям: курячу сліпоту, збільшення ризику виникнення онкологічних патологій передміхурової залози, легенів, захворювання серцевого м'яза, розвиток вікових змін у сітківці ока, захворювання імунної системи. Але треба зазначити, що, незважаючи на схожість між собою, кожна група каротиноїдів справляє свій вплив на певний тип тканин в організмі людини. Не всі види каротиноїдів з однаковою успішністю перетворюються в вітамін А, найкраще це виходить у бета-каротину, а ось альфа-каротин і криптоксантин здатні до таких метаморфоз, але меншою мірою. Тому при виникненні дефіцитного стану, поповнити нестачу цієї речовини можна лише за допомогою фармакологічних препаратів [2]. Каротиноїди – природні антиоксиданти, з цим і пов'язаний їх основний ефект. Найрозповсюдженіші з них – каротини активно синтезуються рослинами, особливо багато їх у листі при переході рослин до цвітіння. Багатими на каротин є корені моркви, шипшина, горобина, смородина, обліпиха. Роль каротину в організмі рослин досліджена не повністю. Судячи за все він бере участь у процесах фотосинтезу, дихання та росту рослин. Каротин здатний легко утворювати перекиси, в яких молекула кисню приєднується в місці подвійного зв'язку, а потім може брати участь в окисненні різноманітних сполук [3]. На сьогодні, найбільш розповсюдженим джерелом каротиноїдів у промисловості є рослини та базидіоміцети. Використання рослин, як джерела каротиноїдів, незважаючи на свою популярність має ряд недоліків: сезонний характер, залежить від екологічного стану ґрунтів та урожаїв рослин, також існує проблема великих посівних площ під вирощування рослин, забезпечувати які дорого. До того ж біодоступність каротиноїдів з соку овочів невелика через високий вміст пігментів, асоційованих з білковими комплексами, що ускладнює їх вивільнення. Раніше вченими також проводилися дослідження щодо синтезу каротиноїдів мікроводоростями. Однак, кількість промислових мікроводоростей, здатних синтезувати важливі для людей β-каротини, астаксантин і лютеїн, доволі обмежена. До того ж, мікроводорості потребують специфічних умов вирощування, підтримувати які в умовах промислового виробництва достатньо дорого. Тому актуальними залишаються дослідження, що спрямовані на пошук нових видів, здатних синтезувати

потрібні речовини, на здешевлення промислових умов культивування та збільшення швидкості отримання продукту без втрати його якості та безпечності [4].

Каротиноїди локалізуються у вигляді складних ефірів і глікозидів у клітинній мембрані мікроорганізмів або у ліпідних гранулах у цитоплазмі. На відміну від еукаріотів, каротиноїди у прокариотах напряму пов'язані із роботою плазматичної мембрани. Утворення пігментів відбувається за умов достатнього доступу кисню і за певного складу живильного середовища. Синтез пігментів бактерій – це доволі чутливий механізм, який швидко реагує на зміну факторів навколишнього середовища, таких як освітленість та температура. Незважаючи на це, мікробіологічний синтез є перспективним методом отримання пігменту, так як мікроорганізми, зокрема бактерії, здатні швидко накопичувати біомасу, а також не потребують великої площі для культивування. Для деяких з них зміна умов зовнішнього середовища може змінювати інтенсивність синтезу. Як наприклад, у *Bacillus licheniformis* A 6/2, *Bacillus mesentericus niger* 236 та *Bacillus mesentericus flavus*. Саме тому з метою здешевлення подальшого промислового виробництва було проведено дослідження, метою якого було експериментально з'ясувати вплив умов культивування, а саме вмісту солі різної концентрації в середовищі та наявності (відсутності) світла на синтез каротиноїдів ґрунтових бактерій [5].

Першим етапом роботи було вирішення проблеми підбору культури бактерій. Після теоретичного визначення груп бактерій, які здатні синтезувати потрібну речовину, були б доступними та не шкідливими для організму людини, нами було обрано бактерії *Bacillus subtilis*. Цей вид бактерій входить до складу біопрепарату фунгіцидної дії «Фітохелп» ТМ «Жива Земля».

У дослідженні наступним кроком було отримання чистої культури бактерій *Bacillus subtilis*. Упаковку з біопрепаратом «Фітохелп» стерилізували в білизні 10 хвилин, після чого за допомогою стерильної мікробіологічної петлі препарат був перенесений у стерильні пробірки на середовище МПА. Після повторного пересіву було отримано колонію чистої бактеріальної культури.

Для культивування контрольного варіанту бактерії *Bacillus subtilis* було використано класичне середовище МПА для бактеріальних культур. Досліджувані варіанти з метою перевірки впливу засоленості на синтез пігментів мікроорганізмів висівали на середовище МПА з додаванням домішок в основне середовище культивування: NaCl в концентраціях 0,6 % та 1 % (для різних варіантів). Виділений штамп *B. subtilis* пересіяно шпателем Дригальського методом "газону" на середовище з різним вмістом солі. Крім того культивування усіх варіантів проводили за різних умов освітленості та температури: у темряві за температури 28 °С та 19-20 °С; на світлі за температури 19-20 °С:

- 1 зразок культивували на класичному середовищі МПА на світлі (рис. 1);
- 2 зразок – на МПА з додаванням 0,6 % NaCl на світлі (рис.1);
- 3 зразок – на МПА з додаванням 1 % NaCl на світлі (рис.1);
- 4 зразок – на класичному середовищі МПА у темряві (рис 2);
- 5 зразок – на МПА з додаванням 0,6 % NaCl у темряві (рис. 2);
- 6 зразок – на МПА з додаванням 1 % NaCl у темряві (рис.2);
- 7 зразок – на МПА у термостаті (у темряві) (рис. 3);
- 8 зразок – на МПА з 0,6 % NaCl у термостаті (у темряві) (рис. 3);
- 9 зразок – на МПА з 1 % NaCl у термостаті (у темряві) (рис.3).

Дослідження проводили в 3 повторностях.

Через 8 діб культивування в різних умовах, проводили відбір бактеріальної культури *Bacillus subtilis* на дослідження вмісту каротиноїдів. Для цього відділяли від середовища чисту

бактеріальну культуру однакової ваги для кожного варіанту. Чистий матеріал поміщали в 96 % етиловий спирт. Екстракцію проводили в темряві за кімнатної температури для запобігання вицвітання пігменту. Після екстракції, суспензію очищували від залишків бактеріальних клітин методом центрифугування 6000 об/хв. Відносну різницю синтезованих пігментів в зразках, вирощених за різних умов, визначали за різним рівнем поглинання екстракту методом спектрометрії [6]. Вимірювання поглинання екстрактів проводили на спектрофотометрі ULAB 102, Китай, на довжинах хвиль 420 нм та 480 нм проти 96 % етилового спирту.



**Рисунок 1. Колонії бактерій Bacillus subtilis. Зразки 1, 2, 3.**



**Рисунок 2. Колонії бактерій Bacillus subtilis. Зразки 4, 5, 6.**



Рисунок 3. Колонії бактерій *Bacillus subtilis*. Зразки 7, 8, 9.

Аналіз результатів вимірювання поглинання показав, що культивування ґрунтових бактерій *Bacillus subtilis* в середовищі МПА з додаванням 1 % NaCl позитивно впливає на збільшення синтезу каротиноїдів за умов вирощування у темряві. Проте, за умов культивування на світлі з високим вмістом солі, в зразках знижується активність синтезу каротиноїдів. Також виявлено, що при додаванні 0,6 % NaCl в середовище культивування та вирощування у темряві за температури 28 °С також відбувається різке зниження кількості пігменту в зразках.

В роботі показано, що досить незначні коливання вмісту солі в складі середовища культивування бактерій виду *Bacillus subtilis* викликають збільшення синтезу каротиноїдів, при чому в темряві цей процес проходить активніше.

#### Література:

1. А. Б. Капитонов, Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма, *Усп. совр. биол.*, Т. 116, №2, с. 179-193, 1996.
2. Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок, Витамины, Минск : Асар, с. 58-63, 2002.
3. В.И. Дейнека, А.А. Шапошников, Л.А. Дейнека, Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения, *Научные ведомости*, № 6, С. 19–25, 2008.
4. В. С. Сааков, Альтернативные пути биосинтеза каротиноидов у Procarota и Eucarota, *Докл. АН России*, Т.392, № 6, с. 825—831, 2003.
5. Л. В. Авдеева, К. Є. Борецька, М. А. Хархота, О. О. Нечипуренко. Синтез пігментів бактеріями роду *Bacillus* при культивуванні на різних поживних середовищах, *Мікробіологічний журнал*, Т. 77, № 1, с. 14-19, 2015.
6. B. Delia Rodriguez-Amaya, Mieko Kimura, Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. Washington: HarvestPlus Technical Monograph., P. 58, 2004.