

## ВИТАМИНПОТРЕБНЫЕ И ВИТАМИНПРОДУЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

А.Х. ПАРОНИЯН, А.А. ЭЛИАЗЯН

*Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян*

Изучено отношение фототрофных бактерий к витаминам группы В и биосинтез этих витаминов фототрофными бактериями, выделенными из минеральных источников Армении. Показано влияние витамина В<sub>12</sub> на образование каротиноидных пигментов несерных пурпурных бактерий. Разработана питательная среда на дешевой основе природной минеральной воды Джермук, вполне пригодной для выращивания фототрофных бактерий и для биосинтеза витаминов.

Ուսումնասիրվել է Հայաստանի հանքային աղբյուրներից անջատված ֆոտոտրոֆ բակտերիաների վիտամինային պահանջներն ու վիտամինների կենսասինթեզը նրանց կողմից: Ցույց է տրվել վիտամին В<sub>12</sub>-ի ազդեցությունը ոչ ծծմբային պուրպուր բակտերիաների կարոտինոիդային գունանյութերի առաջացման վրա: Ջերմուկ բնական հանքային ջրի լծան հիմքի վրա մշակվել է սննդամիջավայր, որը լրիվ պիտանի է ֆոտոտրոֆ բակտերիաների աճի և նրանց կողմից վիտամինների կենսասինթեզի համար:

Vitamins requiring and vitamins biosynthetic properties of phototrophic bacteria isolated from mineral springs of Armenia have been studied. The stimulation of vitamin В<sub>12</sub> on formation of carotenoid pigments of nonsulfur purple bacteria has been shown. The medium on the base of natural mineral water Jermuk was developed which is quite suitable for growth of phototrophic bacteria and biosynthesis of vitamins.

### *Фототрофные бактерии - витамины - каротиноидные пигменты*

Важная роль в образовании витаминов принадлежит микроорганизмам, некоторые из них синтезируются в природе исключительно микроорганизмами [1, 5]. В последнее время возрос интерес исследователей особенно к витамину В<sub>12</sub>. Расширяется круг микроорганизмов, у которых обнаружен зависимый от витамина В<sub>12</sub> синтез ДНК [8, 15]. В литературе имеются немногочисленные данные по биосинтезу витаминов (тиамина, витамина В<sub>12</sub> и др.) с использованием фотосинтезирующих микроорганизмов [10, 12].

Учитывая возможность получения биомассы фототрофных бактерий в качестве побочного ценного продукта при биологической очистке сточных вод различных производств, бытовых стоков, а также на питательных средах на дешевой основе минеральных вод [4, 9, 16], мы ставили цель, помимо витаминных потребностей, изучить витаминообразующую способность фототрофных бактерий при выращивании на основе минеральной воды Джермук.

**Материал и методика.** В работе использовали культуры несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, штаммы D-1, D-2, D-3, D-8, D-10; *Rhodobacter capsulatus*, шт. D-4; *Rhodospseudomonas palustris*, шт. D-6, выделенные из минеральных источников Джермука, а также *Rhodospirillum rubrum*, шт. А-3, выделенный из минеральных источников Арзни [3, 7]. Все указанные микроорганизмы депонированы в Республиканском Центре депонирования микробов. Культуры фототрофных бактерий поддерживали на среде Ормсруда [14].

Для накопления биомассы фототрофных бактерий в качестве основы питательной среды использовали минеральную воду Джермук, разбавленную водопроводной водой (1:1). В качестве органических добавок к минеральной воде использовали гидролизат ила

из расчета 1,5 г ила на 1 литр воды и дрожжевой экстракт в количестве 0,02%. Гидролиз ила проводили с 2н  $H_2SO_4$  в соотношении 10:1, pH среды 6,9-7,1. Контролем служила среда Ормеруда. Культуры выращивали в течение 5-7 суток в анаэробных условиях в люминистате при освещении 1500-2000 люкс и в аэробных условиях в темноте на качалке при 180 об/мин.

Рост культур оценивали спектрофотометрически при длине волны 660 нм на СФ-26 с определением сухого веса. Спектры поглощения клеток культур и экстрактов каротиноидов в видимой области записывали на регистрирующем спектрофотометре "Specord" UV-Vis. Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена [11].

Потребность культур в витаминах определяли на среде Ормеруда с различными сочетаниями витаминов. Витамины добавляли к средам из стерильных растворов в следующих количествах (мкг %): биотин - 0,5; тиамин - 100; никотиновая кислота - 100; пантотеновая кислота - 50; пиридоксин - 100; витамин  $B_{12}$  - 10; пара-аминобензойная кислота (ПАБК) - 50.

Определение тиамина, биотина, пиридоксина, пантотеновой и никотиновой кислот проводили микробиологическим методом Одинцовой [6].

В качестве тест-организмов были использованы культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Ленинградская раса), *Sacch. carlsbergensis* 4228 и *Zygosaccharomyces bisporus* 734. Культуры поддерживали на сусло-агаровой среде.

Витамин  $B_{12}$  определяли методом Куцевой [2]. Тест-организмом служила *Escherichia coli* 113-3, которую поддерживали на пептон-солевой среде. Все тест-организмы были получены из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии РАН. Тест-культуры использовали после 24-часового выращивания при 30°.

**Результаты и обсуждение.** При изучении физиологических особенностей фототрофных бактерий большое внимание было уделено их потребностям в следующих витаминах: биотине, тиамина, никотиновой и пантотеновой кислотах, ПАБК и  $B_{12}$ . Витамины вносили в среды в различных сочетаниях. Контролем служили те же среды с 0,02% дрожжевого экстракта, а также среды без витаминов. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Потребность культур фототрофных бактерий в витаминах группы В

Витамины	Изученные штаммы							
	D-1	D-2	D-3	D-4	D-6	D-8	D-10	A-3
Биотин	+	+	+	-	+	+	+	+
Тиамин	+	+	+	+	-	+	+	-
Пиридоксин	-	-	-	-	-	-	-	-
Никотиновая кислота	+	+	+	-	-	+	+	-
Пантотеновая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-
ПАБК	-	-	-	-	+	-	-	-
Цианокобаламин	-	-	-	-	-	-	+	-

Примечание: (+) - потребность в витаминах, (-) - не нуждается.

Штамм D-10 нуждается в тиамина, никотиновой кислоте, биотине и витамине  $B_{12}$ . Недостаток последнего (менее 10 мкг/л) сказывается не только на росте культуры, но и на синтезе пигментов. В отсутствие в среде витамина  $B_{12}$  исчезает первый каротиноидный пик в спектре поглощения целых клеток и появляется он при 420 нм (рис. 1). Особенно чувствительна культура к отсутствию витамина  $B_{12}$  при повышенной температуре (42°). В этом случае, без витамина  $B_{12}$ , культура совершенно не растет.

Витаминообразующую способность изучаемых несерных пурпурных бактерий исследовали при выращивании на контрольной среде Ормеруда и на минеральной воде Джермук с гидролизатом активного ила. Культуры подвергали анализу в экспоненциальной фазе роста.

Нами отмечены значительные колебания количественного содержания витаминов у изученных штаммов. Различные штаммы на подобранной оптимальной среде продуцировали, мкг/г сухого веса: тиамина - 4,7-6,9; пиридоксина - 0,6-4,0; биотина - 0,03-0,5; пантотеновой кислоты - 290-500; никотиновой кислоты - 290-500 (рис. 2 (а, б, в)). Следует отметить, что минеральная вода особенно благоприятно действует на биосинтез биотина, тиамина и пиридоксина.

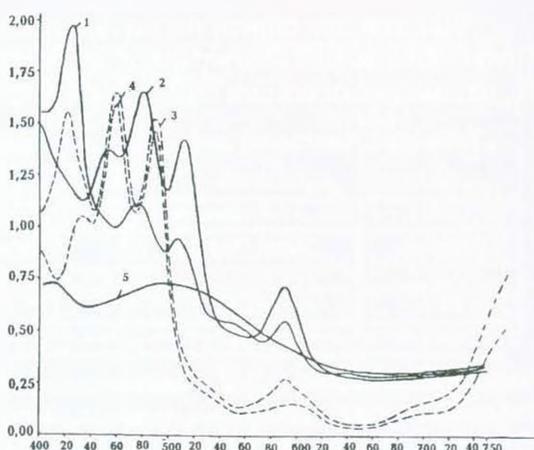


Рис. 1. Спектры поглощения целых клеток и экстрактов каротиноидов *R. capsulatus*, шт. D-10, выращенного в разных условиях с витамином  $B_{12}$  и без него: 1 - целые клетки, выращенные без витамина  $B_{12}$ ; 2 - с витамином  $B_{12}$ ; 3 - экстракт каротиноидов к клеток, выращенных без витамина  $B_{12}$ ; 4 - с витамином  $B_{12}$ ; 5 - целые клетки, выращенные в аэробных условиях в темноте без витамина  $B_{12}$

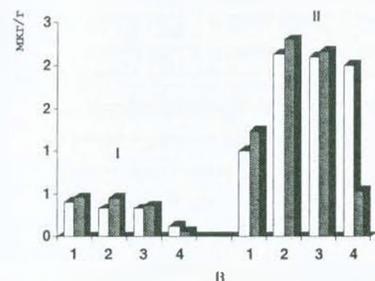
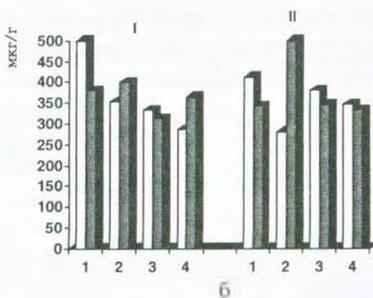
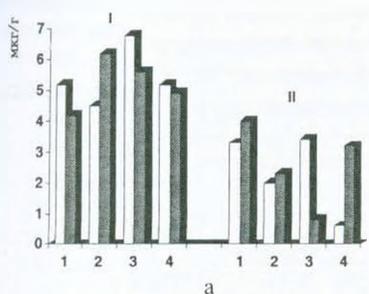


Рис. 2 (а, б, в). Образование витаминов фототрофными бактериями на разных питательных средах: 1 - шт. D-1; 2 - шт. D-2; 3 - шт. D-3; 4 - шт. D-4;  
□ - на среде Ормеруда, ■ - на минеральной воде  
а - содержание тиамина (I) и пиридоксина (II);  
б - содержание пантотеновой (I) и никотиновой (II) кислот;  
в - содержание биотина и витамина  $B_{12}$

Таким образом, среди изученных штаммов фототрофных бактерий выделяются активные по преимущественному содержанию одного из витаминов или их комплекса. Активными по образованию комплекса витаминов оказались штаммы D-1, D-2, D-3, D-4. Характерным для всех штаммов было высокое содержание пантотеновой и никотиновой кислот.

Данные по определению витамина  $V_{12}$  представлены в табл. 2. Полученные данные подтверждают, что изучаемые культуры образуют витамин  $V_{12}$  независимо от состава питательной среды.

Таблица 2. Биосинтез витамина  $V_{12}$  фототрофными бактериями на разных питательных средах

Штаммы	Витамины, мкг/л сухого веса		
	Среда Ормеруда	Солевая среда с гидролизатом ила	Мин.вода Джермук с гидролизатом ила
D-1	0,70	0,87	1,00
D-2	1,10	1,30	1,30
D-3	0,40	0,51	0,63
D-4	1,50	2,05	2,03
D-6	0,25	0,19	0,19
D-8	1,90	1,90	2,10
D-10	1,80	1,95	1,95
A-3	0,48	0,62	0,6

Наиболее активно образуют витамин  $V_{12}$  штаммы D-4, D-8 и D-10 (1,5-2,1 мкг/л).

Установлено, что изучаемые бактерии образуют витамины группы В только в клетках, в культуральную жидкость витамины не выделяют.

В целях дальнейшего увеличения выхода витамина  $V_{12}$  нами исследовалось влияние условий выращивания, а также концентрации кобальта на рост и образование витамина. Для опытов выбрали *R.capsulatus*, штамм D-4 - наиболее активный по биосинтезу этого витамина.

Культуру выращивали в аэробных условиях в темноте и в анаэробных условиях на свету. Результаты опытов приведены в табл. 3.

Таблица 3. Образование витамина  $V_{12}$  культурой *R.capsulatus*, штг. D-4 при разных условиях аэрации

Питательные среды	Аэробно в темноте		Анаэробно на свету	
	Биомасса, г/л	Вит. $V_{12}$ , мкг/л	Биомасса, г/л	Вит. $V_{12}$ , мкг/л
Среда Ормеруда (контроль)	0,78	2,9	1,98	1,33
Среда с минеральной водой	0,9	3,3	2,75	2,21

Полученные данные подтверждают, что в аэробных условиях в темноте увеличивается продуктивность клеток по витамину при небольшом выходе биомассы (табл. 3). У разных микроорганизмов оптимальная концентрация кобальта для биосинтеза витамина  $V_{12}$  различная. Так, у пропионовокислых бактерий и микобактерий 10 мг/л кобальта в среде стимулирует образование витамина, а у *R.palustris* содержание кобальта в среде выше 100 мкг/л угнетает рост бактерий и биосинтез  $V_{12}$  [15].

Данные по влиянию концентрации кобальта на рост и биосинтез витамина  $V_{12}$  фототрофными бактериями представлены в табл. 4.

Как видно из данных таблицы увеличение концентрации кобальта до 10 мг/л подавляет рост изученных штаммов. Оптимальными для роста и биосинтеза витамина  $V_{12}$  являются концентрации кобальта 0,5-1,0 мг/л.

Таблица 4. Влияние концентрации кобальта на рост и биосинтез витамина В<sub>12</sub> фототрофными бактериями

Концентрация СаCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, мг/л	шт. D-4		шт. D-4	
	Рост, OD <sub>660 нм</sub>	В <sub>12</sub> , мкг/л	Рост, OD <sub>660 нм</sub>	Рост, OD <sub>660 нм</sub>
Контроль (без кобальта)	0,56	1,60	0,52	1,80
0,5	0,65	5,00	0,67	5,50
1,0	1,68	5,10	0,69	2,80
10,0	0,20	-	0,25	-

Таким образом, на основании полученных нами результатов можно сделать вывод, что питательная среда на основе минеральной воды Джермук весьма пригодна для выращивания и биосинтеза витаминов группы В фототрофными бактериями. Последние вполне могут служить выгодными микроорганизмами для получения как отдельных витаминов, так и их комплексов. В связи с этим дальнейшее изучение фототрофных бактерий и поиски среди них других биологически активных соединений представляются важным и перспективным как с научной точки зрения, так и практической.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Быховский В.Я.* Микробиологический синтез витамина В<sub>12</sub>. ОНТИТЭИмикробиопром, 10-33, М., 1984.
2. *Кучева Л.С.* Сб.: Витаминные ресурсы и их использование, 5, 133-144, М., 1961.
3. *Малатян М.Н., Арутюнян Т.Г., Паронян А.Х., Кенпен О.И., Александрюшкина Н.И.* Микробиология, 51, 3, 517-519, 1982.
4. *Малатян М.Н., Паронян А.Х.* Прикл. биохим. и микробиол., 33, 2, 238-240, 1997.
5. *Мецлер Д.* Биохимия, 1, 186-305, М., 1980.
6. *Одинцова Е.Н.* Микробиологические методы определения витаминов, 103-204, М., 1959.
7. *Паронян А.Х., Габаева Т.А., Малатян М.Н.* Биолог. журн. Армении, 35, 10, 803-809, 1982.
8. *Прянишникова Н.И., Иордан Е.П.* Микробиология, 67, 1, 26-29, 1998.
9. *Элиазян А.А., Паронян А.Х., Африкян Э.К.* Биотехнология, 6, 51-54, 1997.
10. *Hayashi M., Kamikubo T.* FEBS Lett., 10, 4, 249-552, 1970.
11. *Jensen S.L.* The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems, 104-118, Trondheim, 1962.
12. *Noparatnaraporn, N., Sasaki K., Nishizawa Y., Nagai S.* Biotechnology Letters, 8, 7, 491-496, 1986.
13. *Noparatnaraporn, Trakulnaleumsai, Silveira R. G., Nishizawa Y., Nagai S. J.* Ferment. Technol., 65, 1, 11-16, 1987.
14. *Ormerod J.C., Ormerod K.S., Gest H.* Arch. Biochem. and Biophys., 94, 2, 449-463, 1961.
15. *Robinson J.A., Burkhardt K., Ratnatilleke A.* 4-th European Symposium on vitamin В<sub>12</sub> and В<sub>12</sub> proteins, 14, September 2-6, Innsbruck, Austria, 1996.
16. *Sasaki K., Noparatnaraporn, N., Nagai, S.* In: Martin AM (ed). Bioconversion of waste materials to industrial products, 223-261, Elsevier, 1991.

Поступила 20.XIII.2001