



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 576.8.66.4

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА СОДЕРЖАНИЕ КАРОТИНОИДОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

А.Х. ПАРОНЯН, Л.С. МАРКОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, Абовян

Изучено влияние витаминов группы В на содержание каротиноидов несерной пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, шт. D-10 при выращивании в фотосинтетических условиях. Микроорганизм в качестве факторов роста требует тиамин, ниацин и биотин. Добавление к питательной среде 10-20 мкг/л витамина В₁₂ увеличивает как выход биомассы, так и общее содержание каротиноидов в клетках. Обнаружено, что витамин В₁₂ особенно благоприятно влияет на биосинтез сфероиденона. В присутствии в среде культивирования цианокобаламина значение соотношения основных каротиноидов сфероиден/сфероиденон уменьшается почти вдвое. Показано, что концентрация витамина В₁₂ выше 30 мкг/л подавляет рост культуры.

Ուսումնասիրվել է В խմբին պատկանող մի քանի վիտամինների ազդեցությունը ոչ ծծմբային պուրպուր բակտերիա *Rhodobacter sphaeroides* D-10 շտամի կարոտինոիդների պարունակության վրա ֆոտոսինթետիկ աճի պայմաններում: Միկրոօրգանիզմը որպես աճի խթանիչներ պահանջում է թիամին, նիացին և բիոտին:

Մանրամիջավայրում 10-20 մկգ/լ վիտամին В₁₂-ի առկայությունը նպաստում է ինչպես կենսազանգվածի, այնպես էլ բջիջներում կարոտինոիդների ընդհանուր քանակի ավելացմանը: Հաստատվել է, որ վիտամին В₁₂-ը բարենպաստ ազդեցություն ունի հատկապես սֆերոիդենոնի կենսասինթեզի վրա: Մանրամիջավայրում ցիանոկոբալամինի առկայության դեպքում հիմնական կարոտինոիդների հարաբերությունը (սֆերոիդեն/սֆերոիդենոն) նվազում է մոտ երկու անգամ: Ցույց է տրվել, որ 30 մկգ/լ քանակից բարձր վիտամին В₁₂-ը ճնշում է կուլտուրայի աճը:

The influence of some vitamins of group B on content of carotenoids of purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides* D-10 during photosynthetic growth has been studied. The microorganism requires thiamin, biotin and niacin as a factor of growth. The addition of 10-20 mkg/l vitamin В₁₂ to nutrient medium increases both the yield of biomass and general content of carotenoids. It was shown that vitamin В₁₂ especially influences on biosynthesis of spheroidenon. The presence of cyanocobalamin in the nutrient medium decreases almost twice as much the correlation of main carotenoids spheroiden/spheroidenon. Concentration of vitamin В₁₂ in nutrient medium more than 30 mkg/l suppresses the growth of culture.

Rhodobacter sphaeroides - сфероиден - сфероиденон - витамины группы В.

Каротиноидные пигменты как биологически активные вещества широко используются в медицинской практике, пищевой промышленности и косметике. Обладая широким антиоксидантным свойством, многие каротиноиды, в том числе β -каротин, ликопин нашли применение в медицинской практике в качестве радиопротекторного, антиканцерогенного средства [1]. В микробиологической промышленности в качестве продуцентов каротиноидов широко используются мицелиальные грибы. Однако по разнообразию каротиноидных пигментов они уступают фототрофным бактериям.

Обзор имеющейся литературы показал, что количество и состав каротиноидов у фототрофных бактерий значительно меняется в зависимости от освещения, аэрации, возраста культуры и других факторов роста [10]. В биотехнологии для интенсификации процесса получения биологически активных соединений часто применяют химические вещества-биорегуляторы. Так, стимуляторами ликопинообразования у мукорового гриба *Blakeslea trispora* являются производные пиридина [5]. Однако не изучено влияние витаминов группы В на биосинтез каротиноидов.

Целью настоящего исследования было изучение влияния витаминов группы В на состав и количество каротиноидов фототрофной бактерий *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10.

Материал и методика. В работе использовали несерную пурпурную бактерию *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10, выделенную нами из гидрокарбонатных минеральных источников Джермука [3]. Штамм депонирован в Республиканском Центре депонирования микробов Армении под номером ИНМИА В-6509. Культуру поддерживали и в дальнейшем выращивали на среде Ормеруда [9]. Для изучения пигментов микроорганизм выращивали в анаэробных условиях в 100 мл колбах с притертыми пробками, заполненных доверху питательной средой, в люминостате при освещении 1000 люкс. Отношение бактерии к витаминам группы В устанавливали посредством добавления их в среду Ормеруда взамен дрожжевого экстракта. Для засева опытных колб использовали 4-суточную культуру, которую вносили в количестве 5% от объема опытной среды. Начальное значение pH среды 7,0. Температура культивирования 28-30°. Рост культуры оценивали спектрофотометрически по измерению оптической плотности суспензии клеток на спектрофотометре СФ-26, а также по сухому весу - высушиванием при 105° до постоянного веса осажденных и промытых клеток.

Спектры поглощения целых клеток культуры снимали на регистрирующем спектрофотометре Perkin Elmer, Lambda-800 UV-VIS в диапазоне длины волн 400-550 нм. Для выделения каротиноидов использовали четырехсуточную культуру, выращенную в фотосинтетических условиях. Биомассу собирали и отмывали водой центрифугированием при 6000 об/мин. Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена смесью ацетона с метанолом (7:2 по объему) [8]. Во избежание разрушения пигментов, к клеточным экстрактам добавляли стабилизатор фенозан-30 в концентрации 5×10^{-4} моль/л, отобранный нами ранее для стабилизации каротиноидов фототрофных бактерий [4]. Идентификацию каротиноидов проводили на основании спектров поглощения и величин R_f отдельных пигментов, разделенных путем тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках Silufol ("Кавальер", Чехия).

Разделение пигментов проводили в восходящем токе растворителя бензол: петролейный эфир : ацетон (17:2:1) в темноте. После разделения смеси пигментов на отдельные зоны последние элюировали с пластинок петролейным эфиром (40-60°), измеряли объем и фотометрировали на спектрофотометре. Содержание их в биомассе рассчитывали по формуле (мг на 1г абсолютно сухого вещества).

$$C = \frac{D \times V \times 10}{E^{1\%}_{1\text{ см}} \times P},$$

где D – оптическая плотность раствора по максимуму поглощения; V – объем элюата, мл; $E^{1\%}_{1\text{ см}}$ – коэффициент экстинкции соответствующего пигмента (слоя толщины 1см 1%-ного раствора каротиноида); P – навеска сухой биомассы, взятой на экстракцию, г. При расчете количества каротиноидов использовали коэффициенты экстинкции, приведенные Иенсеном для фотосинтезирующих бактерий [8]. Для сфероидена он составляет 2765, для сфероиденона-2065, а для нейроспорина-2900.

В работе использовали витамины и дрожжевой экстракт фирмы “Serva”(Германия).

Результаты и обсуждение. Пурпурная несерная бактерия *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10 растет в анаэробных условиях на свету и в аэробных - в темноте. Оптимальная температура роста 28-30°. Фотосинтетическими пигментами являются бактериохлорофилл а и каротиноиды сфероиденовой группы. Последние являются производными ликопина. Бактерия нуждается в факторах роста. Витаминами, необходимыми для их роста являются тиамин (1 мг/л), ниацин (1 мг/л) и биотин (0,04 мг/л), которые можно заменять дрожжевым экстрактом. Культура не имеет потребности в цианокобаламине. Однако, при изучении физиологических особенностей штамма, нами была обнаружена связь между биосинтезом каротиноидов и содержанием в питательной среде витамина В₁₂. Поэтому для более подробного выявления этого процесса нами было проведено сравнительное изучение роста и каротинообразования штамма при выращивании с указанными витаминами, которые вводились в среду выращивания в разных сочетаниях. Накопление биомассы *Rh. sphaeroides* и содержание в клетках отдельных каротиноидов при выращивании с разными факторами роста подробно представлены в таблице. Контролем служила среда Ормеруда с дрожжевым экстрактом (вариант 1). При фотосинтетическом росте с дрожжевым экстрактом (0,02%) спектр поглощения целых клеток культуры показывает три основных максимума поглощения при 450, 478 и 510 нм (рис.)

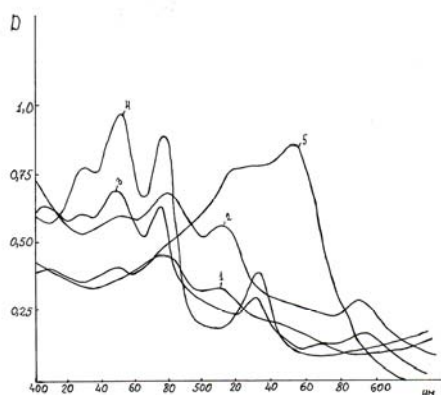


Рис. Спектры поглощения целых клеток *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10, выращенных в фотосинтетических условиях с разными факторами роста: 1-с дрожж. экстрактом; 2- с тиамином, биотином, ниацином; 3- с тиамином, биотином, ниацином и витамином В₁₂ (10 мкг/л), 4- с тиамином, биотином, ниацином и витамином В₁₂ (20 мкг/л); 5 - спектр поглощения водного раствора витамина В₁₂.

Общее содержание каротиноидных пигментов составляет 1,37% сухой массы клеток. В одинаковых условиях роста синтез каротиноидов несколько увеличивается, когда взамен дрожжевого экстракта к среде выращивания добавляется тиамин, ниацин и биотин (вариант 2). Спектр поглощения целых клеток имеет те же максимумы, что и в случае дрожжевого экстракта. В этом случае при некотором понижении выхода биомассы, несколько увеличивается общее содержание каротиноидов до 1,43%. В обоих случаях синтезируется заметно больше сфероидена и меньше сфероиденона.

Интересная картина наблюдается, когда на фоне 3-х витаминов к ферментационной среде добавляется витамин В₁₂. Количественные изменения, происходящие в общем содержании каротиноидов и содержании отдельных каротиноидов совпадают с изменениями максимумов в спектре поглощения целых клеток, которые обнаруживаются при 428, 452 и 476 нм (рис). Опыты показали, что рост и каротиногенез активно протекает при концентрации цианокобаламина 10 мкг/л (вариант 3) и 20мкг/л (вариант 4), а выше 30 мкг/л витамин подавляет рост культуры. Следует отметить, что максимумы поглощения водного раствора чистого витамина В₁₂ не совпадают с максимумами поглощений изучаемых каротиноидов (рис.). Из приведенных данных видно, что в присутствии в среде витамина В₁₂ общее количество каротиноидов увеличивается на 43% по сравнению с дрожжевым экстрактом и на 37% по сравнению с тиамином, ниацином, биотином. Выраженное изменение происходит и в соотношении основных каротиноидов сфероидена и сфероиденона. В присутствии в среде выращивания витамина В₁₂ соотношение сфероиден/сфероиденон уменьшается почти вдвое (табл).

Таблица. Влияние факторов роста на содержание и состав каротиноидов клеток *Rh. sphaeroides*, шт.Д-10 при анаэробном росте на свету

Варианты питательных сред	Биомасса, г/л	Общее содержание каротиноидов, %	Каротиноиды, мг/г сух. биомассы			Соотношение сфероиден/сфероиденон
			Сфероиден	Сфероиденон	Нейроспорин и др. каротиноиды	
Первый	1,12	1,37	11,1	3,45	0,45	3,21
Второй	1,08	1,43	11,6	3,4	0,42	3,4
Третий	1,22	1,83	12,83	8,8	0,67	1,45
Четвертый	1,34	1,96	14,9	10,57	0,78	1,41

Примечание- содержание вариантов см. в тексте.

Несерные пурпурные бактерии рода *Rhodobacter*, в том числе *Rh. sphaeroides*, содержат две формы светособирающих антенных комплексов - LH1 (B875) и LH2 (B800-850), локализованных в внутрицитоплазматических мембранах. Бактериохлорофилл *a* и каротиноиды являются важными структурными и функциональными компонентами антенных комплексов. Сфероиден и сфероиденон являются двумя основными каротиноидами, синтезируемыми бактерией как при выращивании анаэробно на свету, так и аэробно в темноте. У изучаемой культуры сфероиден является промежуточным продуктом биосинтетического пути каротиноидов, когда сфероиденон конечный продукт биосинтеза каротиноидов[2]. Трансформация сфероидена в сфероиденон представляет собой включение 2-оксигруппы в молекулу каротиноида. Количество сфероиденона в клетках культуры увеличивается при высокой интенсивности света, а также при переходе от анаэробных к аэробным условиям, когда культура адаптируется к новым условиям роста [7].

Биологическая активность каротиноидов обусловлена их способностью взаимодействовать с активными формами кислорода или возникающими в процессе свободнорадикальных реакций соединениями. Показано, что небольшое количество синглетного кислорода образуется при выращивании *Rh. sphaeroides* в условиях повышенной освещенности, и это не влияет на рост культуры. Синглетный кислород образуется не только при фотохимической реакции внутри фотосинтетического аппарата, но также под влиянием разных фотосенсибилизаторов. Известно, что метиленовый синий является фотосенсибилизатором и влияет на биосинтез каротиноидов путем образования синглетного кислорода [6].

Известно, что витамин В₁₂ также является фотосенсибилизатором, и его присутствие в среде выращивания приводит к усилению образования синглетного кислорода и увеличению содержания сфероиденона. В связи с тем, что наши опыты проводились в анаэробных условиях при достаточно высоком освещении (1000 люкс), то и это может стать причиной увеличения сфероиденона [7]. Следует отметить, что фотопротекторное действие сфероиденона в клетках *Rh. sphaeroides* выражено сильнее по сравнению с сфероиденом.

В связи с тем, что витамин В₁₂ имеет большую биологическую активность и широкие метаболические функции, то возможно, что увеличение сфероиденона связано с более сложными процессами, происходящими в фотосинтетическом аппарате культуры, что может стать предметом дальнейших исследований.

Представленные данные могут быть использованы при направленном получении каротиноидов сфероиденовой группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гесслер Н.Н., Соколов А.В., Белозерская Т.А. Прикл. биохимия и микробиология, 39, 4, 435-437, 2003.
2. Елисеев А.А., Каплан С. Прикл. биохимия и микробиология, 35, 1, 25-30, 1999.
3. Малатян М.Н., Арутюнян Т.Г., Паронян А.Х., Кеннен О.И., Александрушкина Н.И. Микробиология, 51, 3, 517-520, 1982.
4. Паронян А.Х., Малатян М.Н., Пудель М.Е., Гольденберг В.И. Прикл. биохимия и микробиология, 26, 5, 714-717, 1990.
5. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. Микробиология, 64, 6, 734-740, 1995.
6. Anthony J.R., Warczak K.L., Donohue T.J. PNAS, 102, 18, 6502-6507, 2005.
7. Yeliseev A.A., Erazo J. M., Kaplan S. J. Bacteriology, 178, 20, 5877-5883, 1996.
8. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Trondheim., 199 p. 1962.
9. Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H. Arch. Biochem. Biophys., 94, 3, 449-463, 1961.
10. Takaichi S., Shimada K. Methods in Enzymol., 213, 2, 374-386, 1992.

Поступила 15.08.2007