

О.О. Нечипуренко¹, М.А. Хархота¹, К.С. Бордунос², Л.В. Авдєєва¹

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03680, Україна,
тел.: +38 (093) 762 30 83, e-mail: ne4cipura@ukr.net

²Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72,
Дніпропетровськ, 49010, Україна

РІСТ І УТВОРЕННЯ КАРОТИНІВ ШТАМАМИ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ТА *B. SUBTILIS* 1.1 В УМОВАХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Мета. Дослідити динаміку росту та утворення каротинів штамами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1 в умовах глибокого культивування. **Методи.** Бактерії культивували на синтетичному середовищі та середовищі з м'ясою у періодичних умовах. Кількість абсолютно сухої біомаси бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів (мг/л) встановлювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно. Екстракцію пігментів проводили з використанням суміші хлороформу та метанолу (2:1). **Результати.** Максимальні концентрації бактеріальних клітин штаму *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищі з м'ясою становили $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ та $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, відповідно, що у 10 разів перевищувало значення, отримані на синтетичному середовищі. Вихід біомаси у штаму *B. subtilis* 1.1 на напівсинтетичному середовищі становив 4,5 г/л, а на синтетичному – 1,7 г/л; у штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 5,0 г/л та 2 г/л, відповідно. Загальний вміст каротиноїдів штаму *B. subtilis* 1.1 на розробленому середовищі складав 965 мг/л, на синтетичному – 197 мг/л; для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 1356 мг/л та 173 мг/л, відповідно. **Висновки.** Для отримання високої кількості біомаси і каротиноїдних пігментів досліджених штамів бактерій необхідно використовувати напівсинтетичне середовище з м'ясою. Кількість життєздатних клітин штаму *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування бактерій на такому середовищі була більшою ніж на синтетичному у 10 разів, накопичена біомаса – у 3 та 2,5 рази, загальний вміст каротиноїдів – у 5 та 8 разів, відповідно.

Ключові слова: каротин, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, пігментоутворення.

Інфекційні захворювання шлунково-кишкового тракту та дефіцит вітаміну А призводять до значних втрат поголів'я птиці, зниження приросту маси птиці та яйценосності тощо. У зв'язку з цим вже створено ряд ветеринарних препаратів на основі каротинсинтезувальних стрептоміцетів і дріжджів, пробіотичних штамів бактерій, проте жоден з них не поєднує у собі якості каротинвмісної добавки та пробіотичного препарату [1, 6]. Використання каротинсинтезувальних бактерій



роду *Bacillus*, які характеризуються пробіотичними властивостями є перспективним напрямком вирішення цієї проблеми [11, 13].

Відомо, що за глибинного культивування бактерій максимальної продуктивності можливо досягнути у певній фазі їх росту, однак, дані щодо динаміки синтезу каротиноїдів, взаємозв'язку їх утворення з накопиченням біомаси та спороутворенням бактерій роду *Bacillus* представлені лише у поодиноких публікаціях [11, 13].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити динаміку росту та пігментоутворення каротинсинтезувальних штамів *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1 в умовах глибинного культивування.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 з музею відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Раніше нами було показано, що зазначені культури бактерій здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи, а штам *B. subtilis* 1.1 крім цього характеризується пробіотичними властивостями [3, 4].

Бактерії вирощували на синтетичному середовищі (рН = 7,0±0,3) (г/л): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75, KH_2PO_4 – 9,60, MgSO_4 – 0,18, глюкоза – 20,00 та напівсинтетичному середовищі (рН = 7,5±0,2) (г/л): м'яса (ДСТУ 3696-98) – 23; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6; K_2HPO_4 – 2,0; FeSO_4 – 0,035. Норма внесення інокуляту кожної культури бактерій складала 5 об. %, що відповідало 10^6 – 10^7 колонієутворювальних одиниць на 1 мл середовища (КУО/мл). Культивування бактерій здійснювали на качалках (n = 200 об/хв) за температури 37 С протягом 36 год. Параметри росту (фази росту, питому швидкість росту, час генерації) обраховували згідно до рекомендацій Перт С. Дж. [5].

Кількість життєздатних клітин бактерій у середовищі визначали шляхом висіву 0,1 мл з десятикратних розведень суспензії на м'ясо-пептонний агар. Екстракцію пігментів проводили шляхом гомогенізації сухої біомаси штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 у ступці з поступовим додаванням суміші хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 [11, 13]. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів (мг/л) встановлювали спектрофотометрично з перерахунком за калібрувальними кривими, що отримані шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини та екстрактів пігментів за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно. Спори фарбували за методикою Шеффера-Фултона [12].

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{\text{сєр}}$), середню квадратичну похибку ($S_{x_{\text{сєр}}}$) за кількості повторів дослідів n = 6 та рівнях значимості 0,05 [2].



Результати та їх обговорення

Простим у приготуванні та дешевим у виробництві є середовище з мелясою, яку бактерії використовують як основне джерело карбону та енергії [7]. Тому нами було досліджено ростові показники та рівень пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на синтетичному та напівсинтетичному середовищах. Встановлено, що вищезгадані штами за культивування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах характеризувалися типовими S-подібними кривими росту (рис. 1).

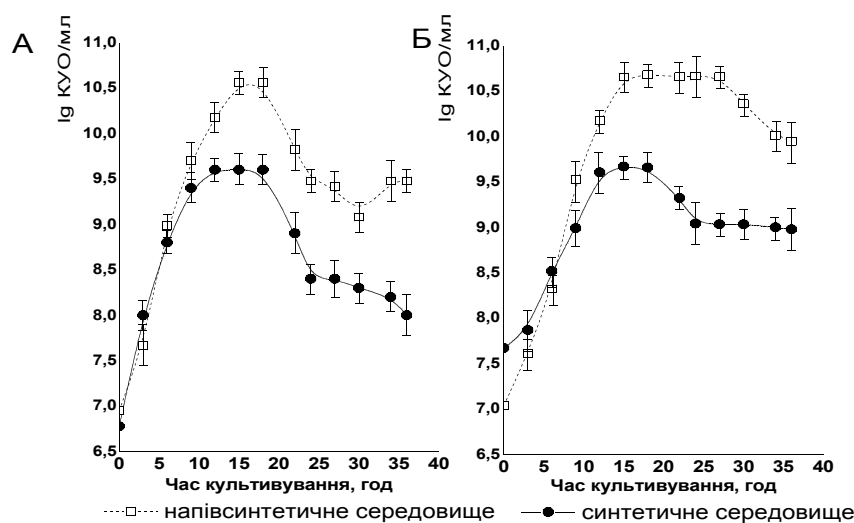


Рис. 1. Динаміка росту бактерій штамів *B. subtilis* 1.1 (А) та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 (Б) за культивування на напівсинтетичному та синтетичному середовищах

Fig. 1. Dynamics of bacteria growth of the strains *B. subtilis* 1.1 (A) and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 (B) during cultivation on semi-synthetic and synthetic media

На середовищі з мелясою максимальна концентрація бактерій *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 становили $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ та $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, відповідно, що у 10 разів перевищує значення, отримані за культивування бактерій на синтетичному середовищі.

Слід зазначити, що протягом 36 годин культивування штамів рН синтетичного і напівсинтетичного середовищ знижувалося від $7,0 \pm 0,3$ і $7,5 \pm 0,2$ до $6,3 \pm 0,2$ та $6,5 \pm 0,2$, відповідно, що вказує на розкладання вуглеводів з утворенням органічних кислот. Спороутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 розпочиналося на 19 та 21 годину культивування, відповідно. На 36 годину культивування 15% бактерій утворювали ендоспори, тоді як відомо, що для більшості пробіотичних бактерій роду *Bacillus* відповідний показник становить близько 90%. Виявлені відмінності можливо пов'язані з різним рівнем експресії генів спороутворення або особливостями умов культивування [10].

Показники росту штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах представлені в таблиці.

Таблиця

Показники росту штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 у логарифмічній фазі росту

Table

Growth parameters of the strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 during logarithmic growth phase

Штам	Середовище культивування	Кількість життєздатних клітин, КУО/мл	Число клітинних поділів	Час генерації, год.	Питома швидкість росту, год ⁻¹
<i>B. subtilis</i> 1.1	Синтетичне	4,3±0,2×10 ⁸	4,85±0,15	1,28±0,06	0,56±0,01
	Напівсинтетичне	3,7±0,3×10 ¹⁰	8,36±0,20	1,11±0,10	0,64±0,02
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113	Синтетичне	4,7±0,1×10 ⁹	5,78±0,08	1,61±0,08	0,45±0,02
	Напівсинтетичне	4,8±0,2×10 ¹⁰	10,10±0,20	1,23±0,07	0,58±0,02

На складному середовищі ростова активність (питома швидкість росту) штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 була більшою, ніж на синтетичному на 14 та 28%, відповідно. Окрім цього, питома швидкість росту обох досліджуваних культур перевищувала на 0,09–0,13 год⁻¹ зазначений показник пробіотичного штаму *B. subtilis* 534 за його культивування на середовищі подібному до напівсинтетичного [6]. Отримані ростові параметри досліджених культур є характерними для бактерій роду *Bacillus* з високим рівнем ростової активності [9].

Основними показниками продуктивності каротинсинтезувальних штамів є вихід АСБ та кількість каротиноїдних пігментів [5]. Тому нами було досліджено динаміку накопичення каротиноїдних пігментів. Встановлено, що синтез каротиноїдних пігментів штамми *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за вирощування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах починався у кінці експоненційної фази росту, що характерно також для синтезу лікопіну у *Streptomyces globisporus* 1912 та апокаротиноїдів у *Bacillus indicus* NU36 [1, 13].

Показано, що на середовищі з м'ясою максимальний вихід біомаси штаму *B. subtilis* 1.1 становив 4,5±0,2 г/л, що у 3 рази перевищувало накопичену біомасу на синтетичному середовищі. До того ж найбільше значення загального вмісту каротиноїдів штаму *B. subtilis* 1.1 на середовищі з м'ясою становило 965±45 мг/л, що майже у 5 разів більше за кількість каротиноїдів отриманих на синтетичному середовищі (рис. 2).



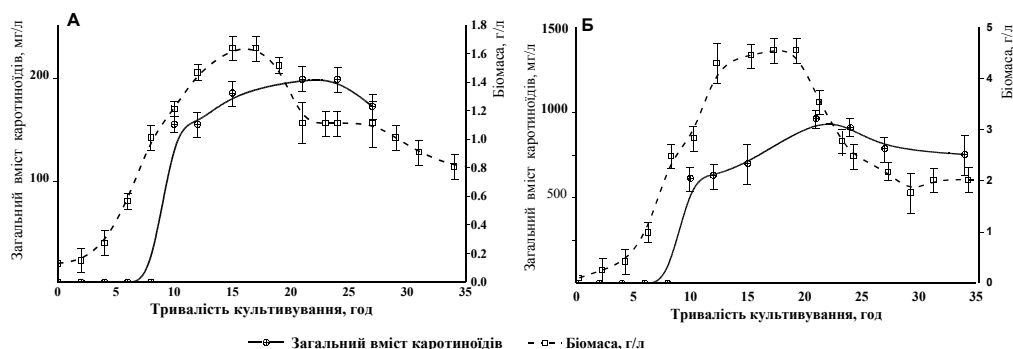


Рис. 2. Динаміка синтезу каротиноїдів штамом *B. subtilis* 1.1 на синтетичному (А) та напівсинтетичному (Б) середовищах

Fig. 2. Dynamics of carotenes synthesis by the strain *B. subtilis* 1.1 on synthetic (A) and semi-synthetic (B) media

Для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 максимальна накопичена біомаса та загальний вміст каротиноїдів при культивуванні на напівсинтетичному середовищі були більшими у 2,5 та 8 разів відповідно, за показники отримані на синтетичному середовищі, і становили $5,0 \pm 0,2$ г/л та 1356 ± 86 мг/л (рис. 3).

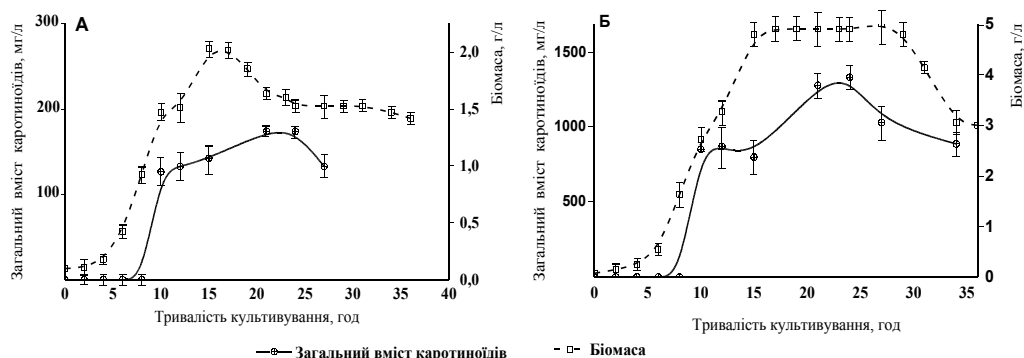


Рис. 3. Динаміка синтезу каротиноїдів штамом *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на синтетичному (А) та напівсинтетичному (Б) середовищах

Fig. 3. Dynamics of carotenes synthesis by the strain *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 on synthetic (A) and semi-synthetic (B) media

Ростова активність та продуктивність досліджених культур були більшими на середовищі з мелясою, ніж на синтетичному, оскільки, меляса окрім цукрів (цукрози, глюкози, фруктози) містить вітаміни та амінокислоти, що можуть покращувати ріст і пігментоутворення штамів; йони заліза індукують спороутворення та каротиногенез у зв'язку з тим, що вони є кофакторами ферментів і здатні виступати індукторами антиоксидантних систем захисту мікробної клітини [8, 14].



Слід зазначити, що у всіх варіантах культивування штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 відмічено наявність двох максимумів накопичення каротиноїдних пігментів. Так, перший максимум припадав на кінець експоненційної фази росту, другий – на кінець стаціонарної чи фази старіння культур. Можливо, в першому випадку каротиноїди переважно асоційовані з молодими вегетативними клітинами, а в другому – зі спорами. Таке припущення ґрунтується на тому, що каротиноїдні пігменти захищають молоді клітини, які швидко діляться, від окисного стресу, а у складі спор – підвищують їх резистентність до несприятливих чинників [13].

Таким чином, для отримання високої кількості біомаси і каротиноїдних пігментів досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* доцільно використовувати напівсинтетичне середовище з мелясою. Кількість життєздатних клітин штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування бактерій на такому середовищі була більшою, ніж на синтетичному у 10 разів, питома швидкість росту – на 14 та 28%, накопичена біомаса – у 3 та 2,5 рази, загальний вихід каротиноїдів – у 5 та 8 разів, відповідно. Біотехнологічні показники для обох штамів були максимальними з 18 по 24 годину культивування.

UDC 579.243+579.222.3:579.66

О. Nechypurenko¹, M. Kharkhota¹, K. Bordunos², L. Avdeeva¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Acad. Zabolotny st., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (093) 762 03 83, e-mail: ne4upura@ukr.net

²Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, 72, Gagarin str., Dnipropetrovsk, 49010

GROWTH AND CAROTENE SYNTHESIS BY THE STRAINS *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113 AND *B. SUBTILIS* 1.1 AT SUBMERGED CULTIVATION

Summary

Aim. The aim was to study the dynamics of the growth and carotene synthesis by the strains *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 and *Bacillus* 1.1 at submerged cultivation.

Methods. Bacteria were cultured on synthetic medium and medium with molasses in periodic conditions. The amount of absolutely dry bacterial mass (g/l), the total content of carotenoids (mg/l) were determined spectrophotometrically at a wavelength of 540 and 440 nm, respectively. The pigments extraction was carried out with the use of mixture of chloroform and methanol (2:1). **Results.** The maximum bacterial cells concentration of the strains *B. subtilis* 1.1 *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 after cultivation on medium with molasses were $3.6 \pm 0.2 \times 10^{10}$ and $4.5 \pm 0.3 \times 10^{10}$ CFU/ml, respectively, and 10 times higher than the values obtained in the synthetic medium. Biomass yield of the strain *B. subtilis* 1.1 on complex medium was 4.5 g/l, and on synthetic – 1.7 g/l; the data for *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 – 5.0 g/l and 2 g/l, respectively. Total carotenoid content of the strain *B. subtilis* 1.1 on complex medium was 965 mg/l of completely dry biomass (CDB), on the synthetic – 197 mg/l; the data for the strain *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 – 1356 mg/l and 173 mg/l, respectively. **Conclusion.** The complex medium with molasses needs to be used to obtain a high amount of bacterial biomass and carotenoid pigments of investigated strains.



*The quantity of viable cells of the strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 after cultivation on medium with molasses was 10 times higher than on synthetic, the maximum biomass – 3 and 2.5 times higher, the total carotenoid content – 5 and 8 times higher, respectively.*

*Key words: carotene, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, pigment production.*

УДК 579.243+579.222.3:579.66

А.А. Нечипуренко¹, М.А. Хархота¹, Е.С. Бордунос², Л.В. Авдеева¹

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина,
тел.:+38 (093) 762 30 83, e-mail: ne4urpura@ukr.net

²Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара, пр. Гагарина, 72,
Днепропетровск, 49010, Украина

РОСТ И ОБРАЗОВАНИЕ КАРОТИНОВ ШТАММАМИ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 И *B. SUBTILIS* 1.1 ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Реферат

Цель. Исследовать динамику роста и образования каротинов штаммами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 и *B. subtilis* 1.1 в условиях глубинного культивирования. **Методы.** Бактерии культивировали на синтетической среде и среде с меласой в периодических условиях. Количество абсолютно сухой биомассы бактерий (г/л), общее содержание каротиноидов (мг/л) определяли спектрофотометрически при длине волны 540 и 440 нм, соответственно. Экстракцию пигментов осуществляли с использованием смеси хлороформа и метанола (2:1). **Результаты.** Максимальные концентрации бактериальных клеток штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при культивировании на среде с меласой составляли $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ и $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, соответственно, что в 10 раз превышало значения, полученный на синтетической среде. Выход биомассы штамма *B. subtilis* 1.1 на полусинтетической среде составил 4,5 г/л, а на синтетической – 1,7 г/л; у штамма *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 5,0 г/л и 2 г/л, соответственно. Общее содержание каротиноидов у штамма *B. subtilis* 1.1 на полусинтетической среде составило 965 мг/л, на синтетической – 197 мг/л; у штамма *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 1356 мг/л и 173 мг/л, соответственно. **Выводы.** Для получения большого количества биомассы и каротиноидных пигментов исследуемых штаммов бактерий необходимо использовать полусинтетическую среду с меласой. Количество жизнеспособных клеток штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при культивировании бактерий на такой среде было больше чем на синтетической в 10 раз, накопление биомассы – в 3 и 2,5 раза, общее содержание каротиноидов – в 5 и 8 раз, соответственно.

Ключевые слова: каротин, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, пигментобразование.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 45–50.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
3. Нечипуренко О.О. Природа та фізико-хімічні властивості каротиноїдних пігментів штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. // XI Український біохімічний конгрес (6–10 жовтня 2014 року, Київ) : тез. доп. – Київ, 2014. – С. 34.
4. Нечипуренко О.О. Пробиотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. // XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (1–6 жовтня 2013 р., Ялта) : тез. доп. – Ялта, 2013. – С. 499.
5. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 116 с.
6. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2. – С. 20–41.
7. Царенко И.Ю., Рой А.А., Кудриш И.К. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Мікробіологічний журнал. – 2011. – Т. 73, № 2. – С. 13–19.
8. Banna A.A., Razeq A.M., Mahdy A.R. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* // Food and Nutrition Sciences. – 2012. – Vol. 3. – P. 64–71.
9. Carvalho A.L., Corrêa F.H., Mariano R.R. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14 // Brazilian archives of biology and technology. – 2010. – Vol. 53 – P. 643–652.
10. Errington J. Regulation of endospores formation in *Bacillus subtilis* // Nature reviews. Microbiology. – 2003. – Vol. 1. – P. 117–126.
11. Khaneja R., Perez-Fons L., Fakhry S. Carotenoids found in *Bacillus* // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – № 108. – P. 1889–1902.
12. Mormak D.A., Casida L.E. Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain // Applied and environmental microbiology. – 1985. – Vol. 49, № 6. – P. 1356–1360.
13. Perez-Fons L., Steiger S., Khaneja R. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers // Biochemica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1811. – P. 177–185.
14. Sibtain A., Fayyaz A., Saeed H. Production of microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus* sp., and *Candida utilis* // Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42. – P. 1225–1234.

Стаття надійшла до редакції 27.02.2015 р.

