

## ЛІПІДИ АВЕРМЕКТИНСИНТЕЗУЮЧОГО ШТАМУ STREPTOMYCES AVERMITILIS УКМ АС 2161

**Петрук Т. В., Козирицька В. Є., Валагурова О.В., Іутинська Г.О.**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. акад. Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143

*Авермектинсинтезуючий штам S. avermitilis УКМ Ас 2161 може утворювати до 12% ліпідів. В сумі загальних ліпідів переважають фосфоліпіди (до 23%), стерини (до 18%) та тригліцериди (до 16%). Зі збільшенням кількості фосфоліпідів авермектинсинтезуюча активність підвищується. Особливістю жирнокислотного складу S. avermitilis УКМ Ас 2161 є наявність низькомолекулярних кислот, які є попередниками при синтезі авермектину.*

Ключові слова: *стрептоміцети, авермектини, ліпіди, жирні кислоти*

Бактеріальні ліпіди є важливими біологічно активними сполуками. Їх метаболізм у бактерій дуже складний і відіграє важливу роль в обміні речовин в клітині [8]. Біологічні функції ліпідів дуже широкі: вони є основними складовими мембран, виконують роль запасного, ізолюючого і захисного матеріалу, є переносником вітамінів, регулятором транспорту води, солей, а також активності деяких ферментів, передавачем біологічних сигналів, імуномодулятором тощо [1]. Загальна кількість ліпідів у мікроорганізмів варіює від 0,2 до 40 % сухої біомаси клітини, але може досягати і більш високих значень за умов, оптимальних для накопичення жиру. Зокрема, актиноміцети можуть синтезувати до 57 % ліпідів [8, 3].

З літературних джерел відомо, що стрептоміцети виду *avermitilis* здатні утворювати авермектини – речовини, які не виділяються в культуральну рідину, а накопичуються в ліпідній фракції міцелію. Це комплекс з 8 близькоспоріднених сполук: чотирьох основних ( $A_{1a}$ ,  $A_{2a}$ ,  $B_{1a}$ ,  $B_{2a}$ ) і чотирьох мінорних ( $A_{1b}$ ,  $A_{2b}$ ,  $B_{1b}$ ,  $B_{2b}$ ). За хімічною природою це 16-членні поліциклічні лактони, що містять диолеандрозу як вуглеводний компонент молекули. Вони мають високу інсектицидну, акарицидну та нематоцидну активність і з успіхом замінюють у сільському господарстві хімічні препарати. Високу антипаразитарну активність проявляють авермектини фракції В [9]. Виділений та селекціонований нами ґрунтовий актиноміцет *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161 може утворювати повний комплекс авермектинів, активна фракція В яких становить близько 40 % [6].

З літератури відомі дані, які свідчать про те, що синтез авермектинів

культурою *S. avermitilis* тісно пов'язаний із синтезом ліпідів: відбувається конкуренція за спільні попередники – оцтову, пропіонову, масляну кислоти; при додаванні в середовище інгібіторів синтезу ліпідів синтез авермектинів теж пригнічується [4]. Спостерігається активізація синтезу авермектину та жирних кислот за наявності глюкози у ферментаційному середовищі, що може свідчити про наявність зв'язку між ними [10]. Не виключено, що збагачення міцелію ліпідами забезпечує розчинення і компартменталізацію авермектинового комплексу в ліпідній фракції та сприяє його синтезу [9].

У зв'язку з вищевикладеним ми вважали за доцільне вивчити ліпідний та жирнокислотний склад продуктивних варіантів *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 за різних умов культивування.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження був один з варіантів *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 (№ 1088), відібраний за результатами попередніх досліджень [6].

Для отримання посівного матеріалу культуру вирощували на модифікованому картопляно-глюкозному агарі протягом 10 діб при 28°C. Синтез проводили в умовах глибинного культивування на поживному середовищі C<sub>10</sub> наступного складу (г/л): соєве борошно -16; дріжджі сухі - 4; крохмаль розчинний – 23; CaCO<sub>3</sub> – 4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; глюкоза – 60; рН 6,2. До 50 мл ферментаційного середовища додавали 2% маточної культури (за об'ємом), культивували на качалках при 240 об/хв в колбах об'ємом 500 мл. Маточну культуру вирощували на середовищі, яке мало такий склад (г/л): соєве борошно –15; дріжджі сухі – 5; глюкоза – 20; рН 6,2 [6]. Для стимулювання процесів біосинтезу культурою авермектинів та ліпідів до складу поживного середовища вносили в різних концентраціях ацетат Na, а також, враховуючи фізіолого-біохімічні особливості штаму, змінювали концентрацію крохмалю. Зважаючи на те, що авермектини є вторинними метаболітами, в одному з варіантів досліджу вносили в середовище глюкозу у два етапи: 4 % на початку + 3 % на 4-ту добу росту [4]. При дослідженні жирнокислотного складу використовували 4 варіанти середовища: №1 – стандартне поживне середовище C<sub>10</sub> з додаванням 7 % глюкози; №2 – середовище C<sub>10</sub> з додаванням 4 % глюкози на початку + 3 % на 4-ту добу росту; №3 – середовище C<sub>10</sub> з половиною дози крохмалю та 7 % глюкози; №4 – середовище C<sub>10</sub> з половиною дози крохмалю та з додаванням 4 % глюкози на початку + 3 % на 4-ту добу росту. Авермектинсинтезуючу активність визначали на 7 та 14 добу.

Ліпіди екстрагували методом Фолча, модифікованим в лабораторії “Produsi microbieni” Інституту мікробіології АН республіки Молдова. Екстракцію здійснювали поетапно:

- обробляли біомасу сумішшю хлороформ : етанол (1:5) та чистим хлороформом при температурі 28°C та постійному помішуванні;
- розділяли хлороформ та етанол на роздільній колонці з використанням дистильованої води;
- висушували хлороформ з ліпідами шляхом фільтрування через безводний  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;
- випарювали хлороформ та зважували ліпіди.

Кількісний та якісний склад ліпідів визначали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках “Silufol” марки UV-254 в системі гексан – диетиловий ефір – льодяна оцтова кислота (73:25:5). Ліпіди на хроматограмах виявляли, оброблюючи останні 10 %-ним спиртовим розчином фосформолібденової кислоти. Аналіз оптичної густини плям на хроматограмі проводили на денситометрі DO-IM для кольорових та чорно-білих пластин [7].

Для приготування метилових ефірів жирних кислот: відбирали 0,1 г лабораторної проби ліпідів однорідної консистенції і в скляній пробірці розчиняли в 1,9 см<sup>3</sup> гексану; у розчин гексану вводили метилат натрію в метанолі концентрації 2 моля/дм<sup>3</sup>. Інтенсивно перемішували протягом 2 хв., відстоювали 5 хв. та центрифугували. Отриманий розчин використовували для аналізу.

Аналіз проводили на газовому хроматографі HP 6890, аналітична колонка FFAP 30 см, d 32 мм.

Біосинтетичну активність оцінювали за кількістю авермектинів (мкг) в 1 см<sup>3</sup> етанольного екстракту з міцелію стрептоміцету [5, 6]. Склад авермектинового комплексу та співвідношення окремих фракцій визначали методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у системі етанол – ацетонітрил – вода (55:22,5:22,5) на приладі Beckman System Gold при 243 нм [2, 6].

**Результати та їх обговорення.** Результати аналізу отриманих даних показали, що при вивченні якісного складу ліпідів *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088) були виявлені наступні класи: фосфоліпіди, моно- та дигліцериди, стерини, вільні жирні кислоти, тригліцериди, ефіри стеринів, воски. Типова хроматограма якісного складу ліпідів представлена на рис. 1.

На ферментаційних середовищах різного складу культура може утворювати від 7,54 до 12,19% ліпідів від ваги сухої біомаси. В сумі загальних ліпідів авермектинсинтезуючого штаму *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088) переважали фосфоліпіди (до 23 %), стерини (до 18 %) та тригліцериди (до 16 %). Враховуючи те, що фосфоліпіди становлять майже четверту частину загальних ліпідів (до 23 %), а їх кількість зростає одночасно із збільшенням авермектинсинтезуючої активності, можна припустити, що саме фосфоліпіди відіграють важливу роль в процесах їх синтезу (табл. 1).

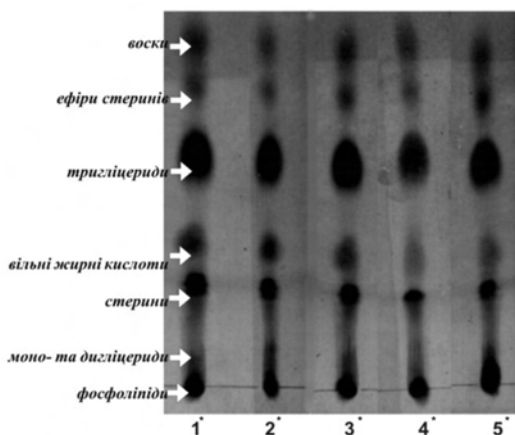


Рис.1. Якісний склад ліпідів *S.avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088)

- 1\* – поживне середовище  $C_{10}$ ;
- 2\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 0,5 г/л ацетату натрію;
- 3\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 1 г/л ацетату натрія;
- 4\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю);
- 5\* –  $C_{10}$  з додаванням глюкози у два етапи.

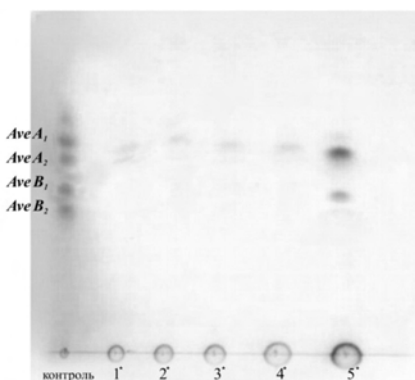


Рис.2. Компонентний склад авермективного комплексу *S.avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088)

- 1\* – поживне середовище  $C_{10}$ ;
- 2\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 0,5 г/л ацетату натрію;
- 3\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 1 г/л ацетату натрія;
- 4\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю);
- 5\* –  $C_{10}$  з додаванням глюкози у два етапи.

Встановлена прямопропорційна кількісна залежність між синтезом ліпідів і авермектинів. Внесення до ферментаційного середовища ацетату натрію, крохмалю та глюкози (у два етапи) позитивно впливало на синтез ліпідів *S. avermitilis*. Разом з тим збільшувалась кількість авермектинів у біомасі, особливо в останньому випадку (рис. 2).

Беручи до уваги літературні дані та результати наших попередніх досліджень [3, 8] синтезу ліпідів та вторинних метаболітів стрептоміцетами, можна прийти до висновку, що низький рівень ліпідів та пряма кількісна залежність між синтезом авермектинів і ліпідів у біомасі авермектинсинтезуючого штаму стрептоміцету зумовлений використанням останніх як джерела вуглецю та енергії не тільки для життєдіяльності клітини, а й значною мірою для синтезу культурою авермектинів. При збільшенні синтезу ліпідів з 7,5% (на середовищі  $C_{10}$ ) до 10,36% у варіанті 4\* кількість синтезованих авермектинів збільшилась на 25%.

Таблиця 1. Накопичення ліпідів *S. avermitilis* за різних умов культивування

Варіант досліджу	Вміст загальних ліпідів, %	Біомаса, г/л	Ліпідні фракції, відсоток до загальних ліпідів						
			фосфо-ліпіди	моно- та дигліцериди	стерини	вільні жирні кислоти	три-гліцериди	ефіри стеринів	воски
1*	7,54	27	21	9	16	10	14	13	17
2*	8,17	23	19	11	18	11	15	14	12
3*	9,63	29	20	11	16	12	16	13	13
4*	10,36	28	19	11	18	11	16	13	12
5*	12,19	32	23	11	15	10	15	15	12

1\* – поживне середовище  $C_{10}$ ;

2\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 0,5 г/л ацетату натрію;

3\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю) + 1 г/л ацетату натрію;

4\* –  $C_{10}$  (1/2 крохмалю);

5\* –  $C_{10}$  з додаванням глюкози у два етапи.

Враховуючи позитивний вплив глюкози на біосинтез авермектину та збільшення жирних кислот у складі ліпідів [10], доцільним було проаналізувати жирнокислотний склад *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088) за різних

умов внесення глюкози в середовище. Використовували звичайне соєве середовище C<sub>10</sub> та середовище зі зменшеною кількістю крохмалю. Глюкозу вносили у відповідності зі стандартною методикою та у два етапи.

В жирнокислотному складі загальних ліпідів, виділених з міцелію авермектинсинтезуючого штаму *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 (варіант 1088), були виявлені кислоти з кількістю вуглецевих атомів від 4-х до 24-х, насичені і ненасичені, з парним і непарним числом атомів вуглецю. В складі жирних кислот переважали: лінолева (від 38 до 47%), олеїнова (від 21 до 28%), та пальмітинова (від 12 до 15%) кислоти. У варіанті з внесенням глюкози в два етапи при зменшеному вмісті крохмалю була присутня масляна кислота (0,8%) та відсутні капринова, каприлова, капронова та лауринова жирні кислоти, що, можливо, пов'язане з використанням цих кислот як попередників у синтезі авермектину при нестачі джерела вуглецевого живлення (табл. 2).

Велика кількість ненасичених жирних кислот значною мірою зумовлює величину коефіцієнта ненасиченості ліпідів досліджуваного штаму. Він становить від 0,3 до 0,4 в залежності від умов культивування. Додавання 7% глюкози на початку культивування спричиняє збільшення вмісту насичених жирних кислот (C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>) у варіантах №1 та №3, у варіантах №2 та №4 переважають жирні кислоти з більшою кількістю вуглецю (C<sub>18</sub>-C<sub>23</sub>) (табл. 2). Відсутність жирних кислот C<sub>6</sub> – C<sub>12</sub> у варіанті досліду №4 говорить про можливу нестачу джерел вуглецю, що імовірно пов'язано з невеликою кількістю крохмалю та глюкози в середовищі.

*Таблиця 2. Жирнокислотний склад S. avermitilis залежно від умов культивування*

Кислота	Вміст кислоти (%) при використанні середовища :			
	№1	№2	№3	№4
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Масляна - C <sub>4:0</sub>	0,4675	0,3148	0,1569	0,7877
Капронова - C <sub>6:0</sub>	0,4495	0,1275	0,5666	0
Каприлова - C <sub>8:0</sub>	0,0562	0,0769	0,0299	0
Капринова - C <sub>10:0</sub>	0,06	0,055	0,0305	0
Лауринова - C <sub>12:0</sub>	0,0934	0,0655	0,0401	0
Миристинова - C <sub>14:0</sub>	1,081	0,6345	0,9636	0,6928

1	2	3	4	5
Пентадеканова - C <sub>15:0</sub>	1,4826	0,7628	1,5487	0,7779
Пальмітинова - C <sub>16:0</sub>	15,913	14,735	13,919	12,204
Пальмітоолеїнова - C <sub>16:1</sub>	3,1503	1,5829	3,384	2,2699
Маргаринава - C <sub>17:0</sub>	0,2544	0,1605	0,269	0,1972
Гептадеценава - C <sub>17:1</sub>	0,1912	0,114	0,0342	0,103
Стеаринова - C <sub>18:0</sub>	5,5426	5,4347	4,0051	4,1938
Олеїнова - C <sub>18:1</sub>	26,478	28,931	21,813	23,045
Лінолева - C <sub>18:2</sub>	38,02	39,775	45,769	47,015
Ліноленова - C <sub>18:3</sub>	3,8211	3,815	5,3028	5,3883
Нонодеканова - C <sub>19:0</sub>	0,0702	0,0898	0,1007	0,0934
Арахінова - C <sub>20:0</sub>	0,4842	0,5366	0,4081	0,4853
Арахідонова - C <sub>20:4</sub>	0	0,0483	0,0384	0
Бегенова - C <sub>22:0</sub>	0,5402	0,6119	0,3485	0,4506
Ерукова - C <sub>22:1</sub>	0,1126	0,1415	0,3485	0,3394
Трикозанова - C <sub>23:0</sub>	0,2102	0,217	0,1853	0,163
Лігноцеринова - C <sub>24:0</sub>	0,2298	0,2922	0,1701	0,1932
Нервонова - C <sub>24:1</sub>	1,1982	0,9083	0,6915	1,1459
Сума насичених кислот	26,935	24,178	22,792	20,237
Сума ненасичених кислот	73,369	75,821	77,601	79,536
Коефіцієнт насиченості	0,4	0,3	0,3	0,3

З літературних джерел відомо, що ліпіди стрептоміцетів різних видів містять жирні кислоти з кількістю атомів вуглецю від C<sub>10</sub> до C<sub>24</sub> [8]. Наявність у ліпідній фракції авермектинсинтезуючого штаму *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 низькомолекулярних жирних кислот (від C<sub>4</sub>) характерно для цього штаму, оскільки низькомолекулярні жирні кислоти є попередниками при синтезі авермектину.

Таким чином, авермектинсинтезуючий штам *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 може утворювати до 12 % ліпідів, до складу яких входять фосфоліпіди, моно- та дигліцериди, стерини, вільні жирні кислоти, тригліцериди, ефіри стеринів, воски.

В складі загальних ліпідів переважають фосфоліпіди (до 23%), стерини (до 18%) та тригліцериди (до 16 %). Зі збільшенням кількості фосфоліпідів спостерігається збільшення авермектинсинтезуючої активності.

Особливістю жирнокислотного складу *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 є наявність низькомолекулярних кислот – масляної, капринової, капронової та каприлової, які є попередниками при синтезі авермектину.

1. Васьковский В.Е. Липиды // Соросов. обозр. журн. – 1997. – № 3. – С. 32-37

2. Викторов А.В., Плешков Е.Н., Кругляк Е.Б. и др. Новый метод ВЭЖХ для определения природных авермектинов групп А и В и олигомицина. Приложение – анализ аверсектина С // Биотехнология. – 1999. – № 5. – С. 79-86.

3. Козырицкая В.Е., Андреюк К.И. Синтез липидов и каротиноидов желтыми стрептомицетами // Acta Biotechnol. – 1984. – Vol. 4, № 1 – С. 59-65.

4. Миронов В.А., Сергеева А.В., Воронкова В.В., Даниленко В.Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т. 42 – № 3. С. 31-36.

5. Мосин В. А., Дриняев В. А., Мирзаев М.Н. Авермектины: колориметрический метод определения в культуральной жидкости *Streptomyces avermitilis* и кристаллических препаратах // Биотехнология. – 1993. – № 1. – С. 9-12.

6. Петрук Т.В., Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Муквич М.С. Підвищення біосинтетичної активності *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161 під впливом N-метил –N-нітро-N-нітрозогуанідину // Мікроб. журнал. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 24-30.

7. Растимешина И.О. Направленный синтез биологически активных веществ штаммом *Streptomyces canosus* CNM-71 и перспективы их использования: Дис. док. биол. Наук: 03.00.07. – Кишинёв, 2001. – 81с.

8. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. – М.: Наука, 1977. – 218 с.

9. Burg W.R. Miller B.M., Baker E.E. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation // Antimicrob Agents Chemother. – 1979. – Vol. 51, № 3 – P. 361-367.



10. Novak J., Rezanka T., Koza T., Vanek Z. Biosynthesis of avermectins and lipids in *Streptomyces avermitilis* // FEMS Microbiol. Lett. – 1990. – Vol. 70. – P. 291-294.

## **ЛИПИДЫ АВЕРМЕКТИНСИНТЕЗИРУЮЩЕГО ШТАММА *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161**

**Петрук Т. В., Козирицкая В. Е., Валагурова Е.В., Иутинская Г.А.**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
г. Киев

*Авермектинсинтезирующий штамм S. avermitilis УКМ Ас 2161 может образовывать до 12 % липидов. В сумме общих липидов преобладают фосфолипиды (до 23 %), стерины (до 18 %) и триглицериды (до 16 %). С увеличением количества фосфолипидов наблюдается увеличение авермектинсинтезирующей активности. Особенностью жирнокислотного состава S. avermitilis УКМ Ас 2161 есть присутствие низкомолекулярных кислот, которые являются предшественниками при синтезе авермектина.*

Ключевые слова: *стрептомицеты, авермектины, липиды, жирные кислоты*

## **LIPIDS OF THE AVERMECTIN SYNTHESIZED STRAIN OF *Streptomyces avermitilis* UCM Ac 2161**

**Petruk T.V., Kozyritskaya V.E., Valagurova H.V., Iutinskaya G.A.**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Kyiv

*Avermectin synthesized strain of Streptomyces avermitilis UCM Ac 2161 capable to form up to 12 % of lipids. In the sum of the general lipids prevailed phosphotides (up to 23 %), sterols (up to 18 %) and triglycerides (up to 16 %). Increasing of avermectin synthesized activity was observed with increasing of phosphotides amount. Peculiarity of fatty acid structure of S. avermitilis UCM Ac 2161 was presence of low-molecular acids that are predecessors by avermectins synthesis.*

Key words: *streptomycetes, avermectins, lipids, fatty acids.*