

ПОДБОР РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ПИГМЕНТА, ИСПОЛЪЗУЕМОГО КАК БИОМАРКЕР ТОПЛИВ, ИЗ КЛЕТОК АКТИНОБАКТЕРИЙ*Глазунова Е.Г., Потапова А.С., Кириллова А.В.**ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18;**e-mail: mia19871@mail.ru**поступила в редакцию 19 ноября 2013 года***Аннотация**

Подобран эффективный метод выделения пигмента пигмента *Agreia bicolorata* Ас-1375, предлагаемого в качестве биомаркера топлив. Среди трех экстрактантов максимальный выход пигмента достигается при использовании изопропанола. Также, методом тонкослойной хроматографии показано, что при экстракции смесью гексана и этанола (1:2), гексана и метанола (1:2) и изопропанола из клеток *Agreia bicolorata* Ас-1375 извлекаются одинаковые пигменты. Установлена норма расхода пигмента для маркировки бензина, равная 5 мкг/л.

Ключевые слова: биомаркер, актинобактерии *Agreia*, пигменты микроорганизмов.

Введение. Маркеры топлив – это вещества химического или биологического синтеза, которые добавляют в топливо для его идентификации. Это позволяет контролировать оборот топлива, а также классифицировать его по качеству (например, соответствие стандартам Евро – 2, 3, 4 и т.д.) [1]. Актуальность маркировки топлив определяется негативными последствиями нелегального производства и экспорта нефтересурсов, наиболее существенными из которых являются низкокачественное топливо для внутреннего пользования и экономические потери бюджета государства. В настоящее время, единственной отечественной разработкой является биомаркер на основе пигмента *Serratia marcescens* продигиозина [2]. Целью работы явилось создание системы маркировки топлива на основе пигментов актинобактерий, которая представляет собой отечественный продукт, полученный биотехнологическим способом и отвечающий основным требованиям, предъявляемым к современным маркерам для нефтепродуктов: растворимость и стабильность в топливе, отсутствие влияния на его свойства и характеристики, быстрый и надежный качественный и количественный анализ содержания маркера в топливе.

Материалы и методы исследования.

В работе использовали штамм *Agreia bicolorata* Ас-1375, предоставленный ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина. Для хранения и выращивания бактерий использовали коринебактериальную питательную среду (КБА) следующего состава (г/л): казеин-пептон – 10, глюкоза – 5, дрожжевой экстракт – 5, хлорид натрия – 5, агар – 15 [3]. Для получения биомассы актинобактерий чашки Петри инкубировали 72 ч при 28°C. Пигменты экстрагировали с помощью смесей гексан: этанол (1:2), гексан: метанол (1:2) и изопропанола как описано у [3].

Экстрагированные пигменты разделяли методом ТСХ на пластинах «Silufol» (Россия) в системе бензол:ацетон (3:1) [3]. Характеристический показатель пигмента R_f вычисляли как отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (см) к расстоянию, пройденному растворителем от линии старта до финиша (см) [4].

Результаты и их обсуждение.

Экспериментально доказано, что пигменты бактерий рода *Agreia* могут выступать в качестве топливных биомаркеров, поскольку соответствуют основным требованиям, предъявляемым к биомаркерам: они растворяются в топливе, при этом маркированный бензин приобретает специфический спектр поглощения [5].

Первый этап работы посвящен разработке эффективного способа получения этого пигмента из клеток. Мы провели экстракцию пигмента с помощью разных растворителей: изопропанола, смеси гексана и этанола (1:2), смеси гексана и метанола (1:2). Показали, что применение трех исследованных экстрактантов позволяет получить спектр с пиком поглощения ~540 нм (рисунок 1), следовательно, все исследованные экстрактанты пригодны для извлечения пигментов из клеток *A. bicolorata* Ac-1375 для последующего использования их в качестве маркеров нефтепродуктов. Однако, при равных объемах биомассы, которая использовалась для получения пигмента, эффективность экстракции выше при использовании изопропанола (таблица 1). Учитывая более низкую стоимость изопропанола по сравнению с остальными тестируемыми экстрактантами, он может быть рекомендован для использования в биотехнологии получения топливных маркеров.

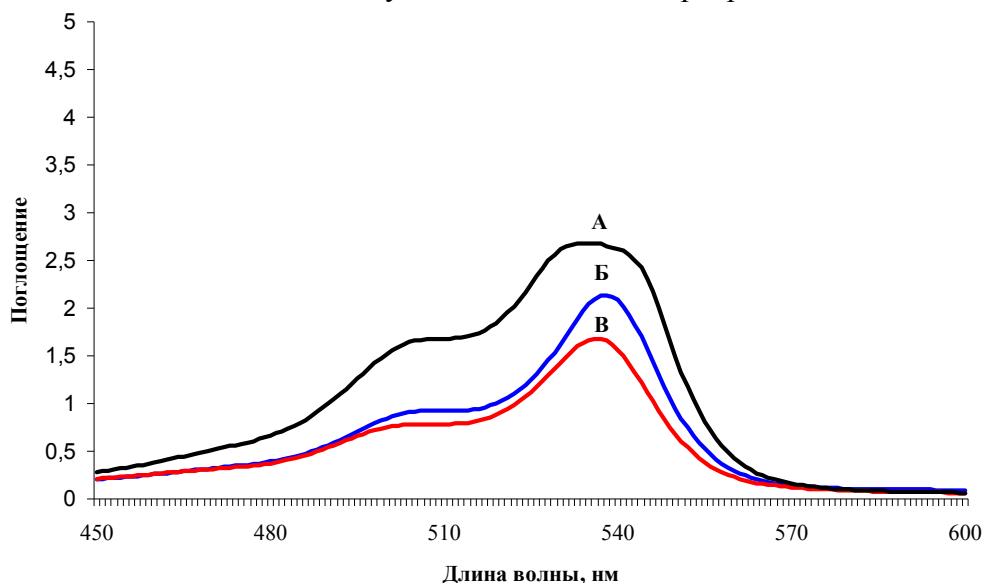


Рисунок 1. – Спектры поглощения пигментов, экстрагированных из биомассы *A. bicolorata* Ac-1375 с помощью изопропанола (А), смеси гексан:этанол (1:2) (Б), гексан:метанол (1:2) (В). Спектры сняты в н-гексане

Таблица 1. – Эффективность экстракции пигментов из клеток *A. bicolorata* Ac-1375 разными экстрактантами.

Экстрактант	ОП ₅₄₀	ОД ₅₉₀	Отношение пигмента к биомассе
изопропанол	10,489	7,451	1,408
гексан:этанол	8,348	7,451	1,120
гексан:метанол	3,131	7,451	0,420

При использовании различных экстрагирующих веществ из биомассы клеток могут выделяться различные пигменты. Для того чтобы выяснить экстрагируются одни и те же пигменты или разные при использовании смеси гексан : этанол (1:2) , гексан : метанол (1:2) и изопропанола провели ТСХ. Наличие одного пятна в хроматограммах указывает на гомогенность исследуемых растворов пигментов (рисунок 2).

Важной характеристикой степени разделения исследуемых веществ в хроматографии является R_f . Данная величина позволяет судить о природе определяемого соединения [4]. Равенство величин R_f для двух образцов анализируемых пигментов свидетельствует об их единой природе. Идентичность пигментов подтверждается сходством спектров поглощения, полученных при спектрофотометрическом анализе образцов, элюированных с пластинки этанолом.

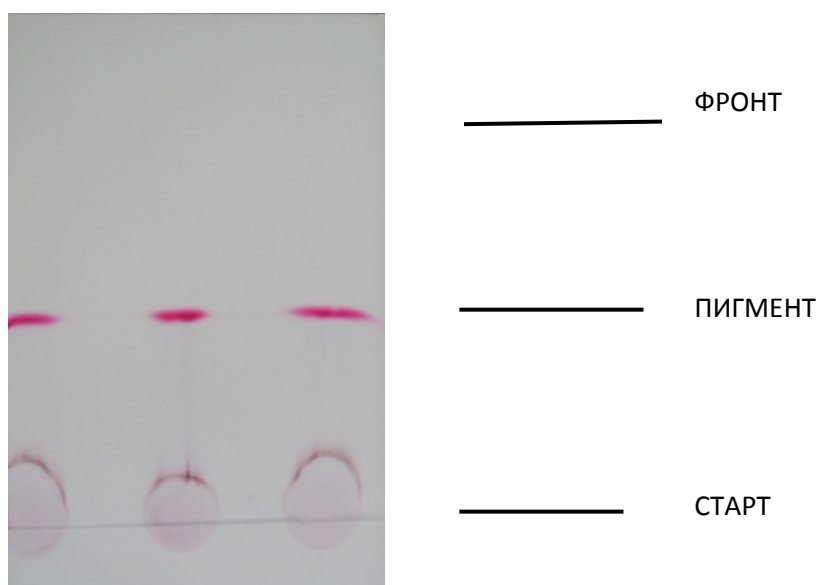


Рисунок 2. – ТСХ пигментов *A. bicolorata* Ac-1375, полученных экстракцией смесью гексан:этанол Rf 0,97 (1:2) (А), гексан:метанол Rf 0,97 (1:2) (В), изопропанолом Rf 0,99 (Б).

Таким образом, с помощью метода ТСХ мы продемонстрировали, что при экстракции с помощью смесей гексан:этанол (1:2), гексан:метанол (1:2) и изопропанолом из клеток *A. bicolorata* Ac-1375 извлекается один и тот же набор пигментов.

При использовании пигмента микроорганизмов в качестве биомаркера топлива важна маркирующая концентрация. Чтобы установить минимальную рабочую концентрацию маркера, мы проанализировали спектры поглощения растворов пигментов в бензине в диапазоне концентраций от 0,3 до 10 мкг/л и установили, что минимальное количество пигмента, которое может быть количественно и качественно определено в топливе спектрофотометрически, составляет 0,6 мкг/л (рисунок 3).

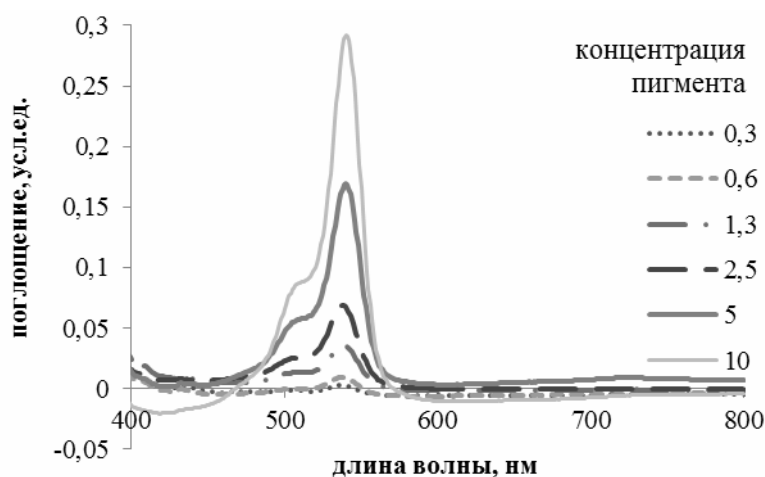


Рисунок 3. – Светопоглощение топлива, маркированного различными концентрациями пигмента.

При концентрации пигмента 5 мкг/мл можно выявить заметный пик поглощения в области 540-550 нм (рисунок 3), при этом не происходит видимого изменения цветности маркированного топлива. Таким образом, данная концентрация 5 мкг/л может быть рекомендована как норма расхода пигмента при маркировании бензинов. Количество продигиозина – единственного запатентованного маркера нефтепродуктов на основе пигментов микроорганизмов, необходимое для маркировки 1 л бензина, равно 1.2-9.3 мкг [6], что сопоставимо с нашими данными по новому пигменту. Таким образом, пигменты *A. bicolorata*, используемые в качестве биомаркера топлива, характеризуются постоянной и низкой пороговой дозой обнаружения.

Заключение. В ходе работы было выявлено, что пигмент *Agreia bicolorata* Ас-1375 (с максимум поглощения при 540-550 нм), перспективный для использования в качестве биомаркера нефтепродуктов, может быть получен экстракцией изопропанолом, смесью гексана и этанола (1:2), смесью гексана и метанола (1:2). Среди трех экстрактантов максимальный выход пигмента достигается при использовании изопропанола. Также, методом тонкослойной хроматографии показано, что при экстракции смесью гексана и этанола (1:2), гексана и метанола (1:2) и изопропанола из клеток *Agreia bicolorata* Ас-1375 извлекаются одинаковые пигменты. Исследуемый пигмент относится к так называемым индикационным маркерам, то есть выявляется с помощью оптической аппаратуры (сканирующего спектрофотометра) и не требует добавления реагентов-проявителей, что выгодно отличает его от маркера на основе продигиозина, который требует для идентификации нефтепродукта добавления в пробу проявляющего реактива – соляной кислоты [4]. Впервые нами установлена норма расхода пигмента для маркировки бензина, равная 5 мкг/л.

Список литературы

- 1) Heemken O.P., Stachel B., Theobald N., Wenclawiak B.W. Temporal variability of organic micropollutants in suspended particulate matter of the River Elbe at Hamburg and the River Mulde at Dessau, Germany // J. Arch Environ Contam Toxicol. 2000. V.38, N1. P.11-31.
- 2) Гарейшина А.З., Петухова Е.В., Юсупова Д.В., Лебедев Н.А., Чертилина Т.Н., Пономарева А.З. Композиция, включающая нефтепродукт и маркер, способ и раствор для маркирования нефтепродукта, способ идентификации нефтепродукта и способ получения маркера // Патент на изобретение RU № 2218381, C10L1/00, C10M159/02, C10N30:20, Приоритет от 22.07.02. – 2003. Бюл. №34.
- 3) Трутко С.М., Дорофеева Л.В., Щербакова В.А., Чувильская Н.А. Распространение немевалонатного и мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов среди бактерий различных систематических групп // Журн. Микробиология. 2005. Т.74, №2. С.185-190.
- 4) Евгеньева И.И. Планарная хроматография и анализ органических веществ // Соросовский образовательный журнал. 1999. №11. С.50-55.
- 5) Глазунова Е.Г., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. Пигменты актинобактерий *Agreia* как перспективные маркеры топлив // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2011. Т.153, кн.2. С.96-99.
- 6) Юсупова Д.В., Габдрахманова Л.А., Куркина М.А., Гурьянов И.Д. Способ идентификации маркированных нефтепродуктов // Патент на изобретение RU № 2368645, C10L1/00, C10M159/02, C10N30:20, Приоритет от 27.09.07. 2009.