

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* K-8 НА ГЛІЦЕРИНІ ВНЕСЕННЯМ ЕКЗОГЕННИХ ПОПЕРЕДНИКІВ

Хом'як Д.І., Кудря Н.В.

Анотація. Показано можливість інтенсифікації біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) при культивуванні *Nocardia vaccinii* K-8 на гліцерині внесенням екзогенних попередників вуглеводної та ліпідної природи. Додавання глюкози (0,05 %) і соняшникової олії (0,1 %) у культуральну рідину на початку стаціонарної фази росту штаму K-8 приводить до підвищення синтезу ПАР на 45–50 % у порівнянні із показниками на середовищі без екзогенних попередників.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* K-8, поверхнево-активні речовини, гліцерин, інтенсифікація біосинтезу

Вступ. Упродовж останніх років поверхнево-активні речовини є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлено їх можливим практичним використанням в промисловості, а також для очищення навколишнього середовища [1, 2]. Перевагами ПАР мікробного походження перед синтетичними аналогами є їх біодеградабельність, стійкість у екстремальних умовах, різноманітна біологічна активність та не токсичність, а такі їх властивості, як здатність до емульгування, зниження поверхневого та міжфазного натягу, дозволяють сподіватися на можливість їх використання для вирішення ряду глобальних проблем [2, 3]. На сьогодні виробництво ПАР є досить високовартісним через використання дорогих субстратів та складного обладнання для очищення і концентрування цільового продукту. Інтенсифікувати синтез цільового продукту мікроорганізмами можна за рахунок внесення екзогенних попередників у середовище культивування продуцента, сприятливий вплив яких зумовлений їх включенням у процеси конструктивного метаболізму або регуляцією синтезу цільового продукту. Щодо джерела вуглецю, то одним з можливих субстратів для одержання ПАР є гліцерин, що у великих кількостях утворюється як побічний продукт виробництва біодизелю. Використання гліцерину у мікробіологічному синтезі вирішить проблему його утилізації і значно здешевить вартість ПАР, а також дозволить суттєво підвищити рентабельність виробництва біодизелю.

У попередніх дослідженнях із забрудненою нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8, і встановлено його здатність до синтезу сполук з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на гідрофобних і гідрофільних субстратах, зокрема на гліцерині і оптимізовано поживне середовище для цього субстрату з використанням математичних методів планування експерименту [1].

Слід зазначити, що незважаючи на широкі перспективи використання у біотехнології представників роду *Nocardia*, у літературі недостатньо відомостей про синтез ними сполук саме з поверхнево-активними властивостями. Так, китайськими вченими було виділено штам *Nocardia* sp.L-417 – продуцент ПАР на середовищі з гексадеканом [2]. У нещодавніх роботах було встановлено можливість синтезу ПАР ліпепептидної та гліколіпідної природи спорідненими з родом *Nocardia* штамми

Nocardiosis alba MSA10 [3] та *Nocardiosis lucentensis* MSA 04 [4]. Наші ж дослідження показали, що за хімічною природою ПАР *N. vaccinii* K-8 є сумішшю нейтральних, гліко- та аміноліпідів [1].

Попередньо нами було показано можливість підвищити синтез поверхнево-активних речовин внесенням у середовище екзогенних попередників біосинтезу – фумарату (C_4 -дикарбонова кислота, попередник глюконеогенезу, що функціонує при вирощуванні бактерій на неуглеводних субстратах) і цитрату (регулятора синтезу ліпідів). Так, за внесення цитрату або фумарату у концентрації 0,1 % кількість отриманих ПАР підвищувалася на 31–36 %, а при спільному внесенні органічних кислот – на 40–45 % [1].

Мета даної роботи – дослідження можливості інтенсифікації синтезу ПАР *N. vaccinii* K-8 на гліцерині внесенням екзогенних попередників вуглеводної та ліпідної природи – глюкози та соняшникової олії.

Методи досліджень. Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $NaNO_3$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,1, pH 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001 г/л.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин в концентрації 1,5 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Попередники вносили у вигляді 10 %-х розчинів у концентрації 0,01–0,5 % (масова частка) на початку процесу культивування, у експоненційній фазі (48 год) та на початку стаціонарної фази росту (72 год).

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30°C упродовж 168 год.

Кількість синтезованих ПАР визначали у г/л ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча [1].

Результати та обговорення. На першому етапі досліджень було вирішено проаналізувати вплив попередників при їх внесенні на початку культивування, а також в експоненційну та стаціонарну фазу росту штаму K-8. Враховуючи позитивний вплив на біосинтез ПАР за внесення органічних кислот у концентраціях 0,1–0,5 %, глюкозу та соняшкову олію вносити у аналогічній кількості.

Як видно із представлених в табл. 1 даних, оптимальним виявилось внесення глюкози на початку стаціонарної фази росту у концентрації 0,1 %, що дозволило збільшити кількість отриманих ПАР на 32 %. Внесення вуглеводню на початку суттєво не підвищувало вихід цільового продукту, а при додаванні у експоненційній фазі росту навпаки спостерігалось інгібування. Для соняшникової олії найвищі результати також було отримано при її внесенні на початку стаціонарної фази.

На наступному етапі було вирішено проаналізувати вплив даних сполук у нижчих концентраціях (табл. 2). Результати кількісного визначення підтвердили оптимальну концентрацію соняшникової олії, а для глюкози найвищу кількість ПАР (на 45 % більше порівняно з контролем) отримали при її внесенні у концентрації 0,05 %.

Таблиця 1

Вплив глюкози і соняшникової олії на синтез ПАР N. вассінії К-8

Попередник	Момент внесення	Концентрація, %	Кількість ПАР, г/л	Кількість ПАР, г/л % від контролю
Контроль (без попередників)	-	-	1,72 ± 0,09	-
Глюкоза	на початку	0,1	2,08 ± 0,10	120,9 ± 6,1
		0,3	1,80 ± 0,09	104,7 ± 5,2
		0,5	1,76 ± 0,09	102,3 ± 5,1
	експоненційна фаза	0,1	0,98 ± 0,05	57,1 ± 2,9
		0,3	1,14 ± 0,06	66,3 ± 3,3
		0,5	1,02 ± 0,05	59,3 ± 3,0
	стаціонарна фаза	0,1	2,28 ± 0,11	132,6 ± 6,6
		0,3	2,24 ± 0,11	130,2 ± 6,5
		0,5	1,90 ± 0,10	110,5 ± 5,5
Олія	на початку	0,1	1,64 ± 0,08	95,5 ± 4,8
		0,3	1,80 ± 0,09	104,7 ± 5,2
		0,5	1,84 ± 0,09	107,1 ± 5,4
	експоненційна фаза	0,1	2,16 ± 0,11	125,6 ± 6,3
		0,3	2,12 ± 0,11	130,2 ± 6,5
		0,5	1,96 ± 0,10	114,1 ± 5,7
	стаціонарна фаза	0,1	2,56 ± 0,13	148,9 ± 7,4
		0,3	2,48 ± 0,12	144,2 ± 7,2
		0,5	2,16 ± 0,11	125,6 ± 6,3

Таблиця 2

Синтез ПАР N. вассінії К-8 при внесенні попередників у концентраціях 0,01–0,1 % на початку стаціонарної фази росту

Попередник	Концентрація, %	Кількість ПАР, г/л	Кількість ПАР, г/л % від контролю
Контроль (без попередників)	-	1,96 ± 0,10	-
Глюкоза	0,01	2,10 ± 0,11	107,1 ± 5,4
	0,03	2,36 ± 0,12	120,4 ± 6,0
	0,05	2,84 ± 0,14	144,9 ± 7,2
	0,1	2,62 ± 0,13	133,7 ± 6,7
Олія	0,01	2,22 ± 0,11	113,3 ± 5,7
	0,03	2,34 ± 0,12	119,4 ± 6,0
	0,05	2,78 ± 0,14	141,8 ± 7,1
	0,1	2,94 ± 0,15	150,0 ± 7,5

Слід зазначити, що у літературі в основному зустрічаються дані по інтенсифікації синтезу ПАР внесенням глюкози не як попередника біосинтезу, а як додаткового джерела вуглецю. Так, при культивуванні *Pseudomonas aeruginosa* SP4 на середовищі з пальмовою олією максимальні показники синтезу ПАР спостерігали при додаванні глюкози як ко-субстрату (лише на початку культивування) [5], а для мутантного

Pseudomonas putida 300-B найвищий вихід рамноліпідів (4,1 г/л) одночасно з найвищим рівнем біомаси (3,5 г/л) отримано при культивуванні на соєвій олії з внесенням глюкози як додаткового субстрату [6].

Висновки. Таким чином, встановлено, що внесення глюкози (0,05 %) і соняшникової олії (0,1 %) на початку стаціонарної фази росту дозволяє інтенсифікувати біосинтетичні процеси і збільшити кількість цільового продукту на 45–50 %.

Подяка. Автор висловлює ширю подяку науковому керівнику – д.б.н., проф. Пирог Тетяні Павлівні.

Література

1. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.П., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. – 2011. - Т. 73, № 4. – С. 15–24.
2. Kim S.H., Lim E.J., Lee S.O., Lee J.D., Lee T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp.L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2000. – Vol. – 31. – P. – 249–253.
3. Gandhimathi R., Kiran G.S., Hema T.A., Selvin J. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10 // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2009. – Vol. 32. – P. 825–835.
4. Kiran G.S., Thomas T.A., Selvin J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2010. - Vol. 78. – P. 8–16
5. Pansiripat S., Pornsunthorntawe O., Rujiravanit R. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio // Biochem. Engin. J. – 2010. – N 49. – P. 185–191.
6. Raza Z.A., Khan M.S., Khalida Z.M. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant // Proc. Biochem. – 2007. – Vol. 42, N 4. – P. 686–692.

Авторська довідка.

1. Хом'як Данило Іванович, магістрант, кафедра біотехнології і мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: khomdan@ukr.net
2. Кудря Надія Володимирівна, студентка 3го курсу, кафедра біотехнології і мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: ms.nelli@rambler.ru