

Т.П. Пирог^{1,2}, Н.А. Гриценко¹, Д.И. Хомяк¹, А.Д. Конон¹, С.И. Антонюк¹

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* К-8 ПРИ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ

Селекционирован штамм бактерий *Nocardia vaccinii* К-8 – продуцент поверхностно-активных веществ (ПАВ) на глицерине (побочный продукт производства биодизеля из растительных масел и животных жиров).

С помощью однофакторных экспериментов и математических методов планирования оптимизирован состав питательной среды, обеспечивающий максимальные показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 (0,5 г/л NaNO_3 , 0,3 г/л дрожжевого экстракта и 1,5 % глицерина).

По химическому составу ПАВ, синтезированные *N. vaccinii* К-8 на глицерине, являются комплексом нейтральных, глико- и аминоклидов. Нейтральные липиды представлены миколовыми и п-алкановыми кислотами, гликолипиды – трегалозодиацилатами и трегалозомиколатами. Одновременное внесение в среду с глицерином 0,2 % фумарата (предшественник глюконогенеза) и 0,2 % цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста штамма К-8 сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 40 % по сравнению с культивированием бактерий на среде без органических кислот.

Ключевые слова: бактерии рода *Nocardia*, поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, отходы производства биодизеля.

Глицерин – простой спирт (1,2,3-пропантриол), является одним из основных продуктов трансэтерификации растительных масел и животных жиров [6, 17]. На сегодняшний день этот спирт в огромных количествах образуется при производстве биодизеля в качестве побочного продукта технологии, и с каждым годом его накапливается все больше и больше [4, 6, 17]. Отметим, что на каждые 100 л биодизеля образуется приблизительно столько же технического глицерина. Только за период с 2004 по 2006 год цена на глицерин снизилась более чем в 10 раз. Известные потребители глицерина – парфюмерно-косметическая промышленность, военно-промышленный комплекс – не способны обеспечить достаточный уровень его утилизации [17]. Поэтому необходим поиск альтернативных путей решения этой проблемы.

Некоторые стратегии базируются на химической и биологической переработке глицерина. Биологическая модификация позволяет обойти недостатки химического катализа (низкая специфичность, использование высокого давления и температуры), производя при этом огромное количество разнообразных практически ценных продуктов, в том числе и микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В последние годы микробные ПАВ являются объектом интенсивных теоретических и прикладных исследований, что обусловлено их возможным практическим использованием в

твами микроновых ПАВ по сравнению с химическими аналогами является биодegradability, нетоксичность, постоянство физико-химических свойств в широком диапазоне температуры [3].

В предыдущих исследованиях из загрязненных нефтью образцов почвы выделены н окисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Noc vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium* sp.K-2 [1]. Установлена во: ность очистки воды, загрязненной нефтью (100 мг/л), иммобилизованными на кераи клетками *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaccinii* K-8. Известно, что способность к ассими углеводородных субстратов у микроорганизмов часто обусловлена синтезом ПАВ [3].

Цель данной работы – исследовать возможность образования поверхностно-активн шеств *N. vaccinii* K-8 на глицерине и установить условия культивирования бактерий на субстрате, обеспечивающие повышение синтеза ПАВ.

Материалы и методы. Культивирование *N. vaccinii* K-8 осуществляли на базовой ж минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 1,0; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; pH 6,8–7,0. Эта среда предложена корейскими аи ми для культивирования бактерий рода *Nocardia* [9].

При изучении влияния природы источника азота на синтез ПАВ *N. vaccinii* K-8 рат натрия был заменен на эквимоларные по азоту концентрации KNO_3 , или $\text{NH}_4\text{NO} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$.

При оптимизации состава питательной среды с помощью методов математическог нирования эксперимента использовали варианты среды, в которых концентрация NaN ставляла 0,5 и 1,5 г/л. В качестве источника углерода и энергии использовали глице концентрации 0,5–3,5 % (по объему). В среду дополнительно вносили дрожжевой экстр концентрации 0,15–0,5 г/л.

Исследования по оптимизации состава питательной среды осуществляли по схеме п го факторного эксперимента (ПФЭ) 2^3 , включающего план по каждому фактору (компл среды – нитрат натрия, глицерин, дрожжевой автолизат), представленному в минималы максимальных его концентрациях. Полученные результаты анализировали согласно алг му Иетса с использованием формул, рекомендованных в практикуме [2].

В одном из вариантов в среду с глицерином в начале стационарной фазы роста в ли цитрат и фумарат натрия (0,1–0,5 %). Соли органических кислот вносили в среду в 10 %-ных растворов.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродног тания, и при добавлении их в среду меняется не только концентрация углерода, но и ношение C/N, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания осно источника углеродного питания (глицерин). Цель коррекции – ввести эквимоларное кол тво углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в культивирования продуцента.

В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенн глюкозо-картофельном агаре (ГКА), а также культуру из экспоненциальной фазы роста, щенную на среде указанного выше состава с 0,5 % глицерина. Количество инокулята – от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл). В одном из экспериментов количеств кулята составляло 5 и 15 %.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на кз (320 об/мин) при 30 °C в течение 96–168 ч.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: поверхностное на ние (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (Γ безразмерная величина), индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости, а количество синтезированных ПАВ (г/л) и выход ПАВ (% от субстрата), которые опреди как описано нами ранее [12].

Качественный анализ поверхностно-активных липидов проводили методом тонк ной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 («Merck», Герм в 4 системах растворителей: полярная система I – хлороформ–метанол–вода (85:15:1 лярная система II – хлороформ–метанол–вода (65:15:2); неполярная система III – гекса

ты: пластинки окрашивали спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и парами йода (нейтральные липиды), раствором нингидрина (аминолипиды), анисовым альдегидом и антроновым реактивом (гликолипиды) Липиды экстрагировали из культуральной жидкости и супернатанта смесью хлороформ–метанол, как описано ранее [12]. Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [12]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе изучали влияние некоторых условий культивирования на синтез ПАВ *N. vaccinii* K-8. Исследование зависимости образования поверхностно-активных веществ от природы источника азотного питания показало, что оптимальным источником азота для *N. vaccinii* K-8 является нитрат натрия (табл. 1). Отметим, что и литературные данные свидетельствуют о том, что наиболее благоприятным источником азота для синтеза ПАВ бактериями рода *Nocardia* (правда, на гексадекане) также является нитрат натрия [9].

Дальнейшие эксперименты были посвящены установлению оптимального способа подготовки посевного материала, обеспечивающего максимальные показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* K-8. Вначале исследовали влияние дрожжевого экстракта и сульфата железа в среде для получения инокулята на синтез ПАВ *N. vaccinii* K-8. Мы предполагали, что наличие в клетках бактерий эндогенных запасов после выращивания на агаризованной среде (первый этап получения посевного материала) позволит исключить эти компоненты из состава жидкой среды для получения инокулята на втором этапе. В биотехнологических процессах в качестве посевного материала обычно используют культуру из экспоненциальной фазы роста. Отметим, что длительность получения такого инокулята приблизительно в два раза меньше, чем продолжительность производственного биосинтеза. В связи с этим предположили, что концентрацию источника азота в среде для получения посевного материала можно снизить.

Таблица 1

Влияние природы источника азота на накопление биомассы и ПАВ *N. vaccinii* K-8

Источник азота	Показатели процесса	
	ПАВ*	Биомасса, г/л
NaNO_3	$4,2 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,06$
KNO_3	$2,6 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,05$
NH_4NO_3	$1,2 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,01$
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}$	$1,7 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,01$

Примечания. Получение инокулята и культивирование осуществляли на базовой среде, содержащей 0,5 % глицерина, 0,25 г/л дрожжевого экстракта и 0,001 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Посевной материал (10 %) выращен до середины экспоненциальной фазы роста. Длительность культивирования 168 ч.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, наше предположение о возможности снижения содержания нитрата натрия в среде для получения посевного материала подтвердилось. Кроме того, эксперименты показали, что наличие в такой среде дрожжевого экстракта и сульфата железа положительно влияет на синтез ПАВ.

Поскольку синтез ПАВ зависит не только от физиологического состояния (фазы роста) инокулята, но и от его концентрации, на следующем этапе определяли оптимальную для образования ПАВ *N. vaccinii* K-8 концентрацию посевного материала. В этих экспериментах использовали инокулят из середины экспоненциальной фазы роста (табл. 3).

Полученные результаты показали, что максимальное значение условной концентрации ПАВ наблюдалось при использовании 10 % посевного материала.

Представленные в табл. 2 данные показывают зависимость синтеза ПАВ от содержания таких компонентов среды как источник азота (NaNO_3) и дрожжевой экстракт. Еще одним важным компонентом, концентрация которого влияет на синтез ПАВ, является источник углерода

При этом авторы пользуются информацией конца 80-х годов XX ст., когда в литературе описан штамм *Nocardia erythropolis* – продуцент трегалозомиколатов. Однако сейчас же штамм *Nocardia erythropolis* был реклассифицирован как *Rhodococcus erythropolis*.

Наши исследования показали, что изолированный нами штамм *N. vaccinii* K-8 образует комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов, причем гликолипиды преобладают в основном трегалозомиколатами.

Таким образом, наши данные являются одними из первых, свидетельствующих о способности представителей рода *Nocardia* синтезировать необычные по химическому составу на глицеринсодержащей среде. Отметим, что установленная с помощью математических методов планирования эксперимента концентрация глицерина для синтеза ПАВ K-8 составляет 1,5 %, что ниже, чем известная из литературы (от 2 до 10 %). У штамма *N. vaccinii* K-8 образуется больше ПАВ, чем другие известные продуценты [5, 10], выход целевого продукта от субстрата у селекционированного нами штамма K-8 существенно выше.

Приведенные в работе данные показывают эффективность математических методов планирования эксперимента для оптимизации состава питательной среды. Так, математический показатель условной концентрации ПАВ*, полученный в однофакторных исследованиях (4,2), ниже по сравнению с результатами экспериментов, в которых применялись классические методы планирования. В частности, на первом этапе, когда концентрации факторов были выбраны на основе теоретических рассуждений и результатов однофакторных экспериментов, удалось повысить показатель ПАВ* до 4,8, а уже на втором, когда диапазоны факторов установлен с помощью уравнения регрессии, условная концентрация ПАВ составляла 5,2. В работе [11] авторами с помощью математических методов оптимизации питательной среды удалось в 3,5 раза повысить количество синтезированных *erythropolis* МТСС 2794 поверхностно-активных веществ.

Сравнительная оценка данных о влиянии фумарата и цитрата на синтез ПАВ K-8 (табл. 9) и наших предыдущих исследований, проведенных с *R. erythropolis* ЭК-1, показала, что эффективность от использования органических кислот была выше у штамма ЭК-1. Так, при внесении фумарата (0,2 %) и цитрата (0,1 %) в среду с гексадеканом синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 повышался на 55–65 %. Отметим, что на штамм K-8 (в отличие от штамма ЭК-1) не проводили исследований по влиянию оптимальных концентраций органических кислот, обеспечивающих максимальный выход ПАВ. Тем не менее, представленные в данной работе результаты о повышении синтеза ПАВ *N. vaccinii* K-8 в присутствии фумарата и цитрата свидетельствуют о том, что потенциальные резервы для интенсификации процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ у данных бактерий.

Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность и условия для синтеза поверхностно-активных веществ глицерина – побочного продукта биодизеля и установлены оптимальные для синтеза ПАВ условия культивирования штамма K-8 на этом субстрате.

Т.П. Пирог^{1,2}, Н.А. Гриценко¹, Д.І. Хом'як¹, А.Д. Конон¹, С.І. Антон²

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИЩ *NOCARDIA VACCINII* K-8 ЗА БІОКОНВЕРСІЇ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ

Резюме

Селекціоновано штам бактерій *Nocardia vaccinii* K-8 – продуцент поверхнево-активних речовин (ПАР) на гліцерині (побічний продукт виробництва біодизелю з рослинних олій і тваринних жиру).

За допомогою однофакторних експериментів і математичних методів планування експерименту оптимізовано склад поживного середовища, що забезпечує максимальні показники синтезу ПАВ K-8 (0,5 г/л NaNO₃, 0,3 г/л дріжджового екстракту і 1,5 % гліцерину).

трегалозодіацелатами і трегалозоміколатами. Сумарно марату (попередник глюконеогенезу) і 0,2 % цитрату (регулятор синтезу ліпідів) на початку стаціонарної фази росту штаму K-8 супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАВ на 40 % порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот.

Ключові слова: бактерії роду *Nocardia*, поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, відходи виробництва біодизелю.

T. P. Pirog^{1,2}, N. A. Gritsenko¹, D. I. Khomyak¹, A. D. Konon¹, S. I. Antonuk¹

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

² Zabolomy Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

OPTIMIZATION OF SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS OF *NOCARDIA VACCINII* K-8 UNDER BIOCONVERSION OF BIODIESEL PRODUCTION WASTE

Summary

A strain of bacteria *Nocardia vaccinii* K-8 – a producer of surfactants has been selected on glycerol (by-product of biodiesel production from oils and animal fats).

Composition of nutrient medium providing for maximal indices of *N. vaccinii* K-8 surfactants synthesis (0.5 g/l of NaNO₃, 0.3 g/l of yeast extract and 1.5% of glycerol) has been optimized with the help of one-factor experiments and mathematical methods of design.

As to their chemical composition the surfactants of *N. vaccinii* K-8 synthesized on glycerol are a complex of neutral, glyco- and aminolipids. Neutral lipids are presented by mycolic and α -alkane acids, glycolipids – by trehalosodiaceates and trehalosomycolates. Simultaneous introduction of 0.2% of fumarate (precursor of gluconeogenesis) and 0.2% of citrate (regulator of lipids synthesis) into the medium with glycerol at the beginning of the stationary phase of K-8 strain growth was accompanied by the 40% increase of the conditional surfactants concentration as compared with bacteria cultivation on the medium without organic acid.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Nocardia* genus bacteria, biosurfactants, biosynthesis intensification, biodiesel production waste.

The author's address: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С. 58–63.
2. Практикум по микробиологии / Под редакцией А.И. Нетрусова. – М.: ACADEMIA, 2005. – 604 с.
3. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 87, N 2. – P. 427–444.
4. Ciesielski S., Pokoj T., Klimiuk E. Cultivation-dependent and independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw glycerol // J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 20, N 5. – P. 853–861.
5. Das P., Mukherjee S., Sen R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium // Biores. Technol. – 2009. – 100, N 2. – P. 1015–1019.
6. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – 27, N 1. – P. 30–39.
7. Freitas F., Alves V., Pais J., et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol // Biores. Technol. – 2009. – 100, N 2. – P. 859–865.
8. Khamduang M., Packdibamrung K., Chutmanop J. et al. Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 36, N 10. – P. 1267–1274.
9. Kim S.H., Lim E.J., Lee S.O. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2000. – 31, N 3. – P. 249–253.

10. Morita T., Konishi M., Fukuoka T. et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T // J. E Bioeng. – 2007. – 104, N 1. – P. 78–81.
11. Pal M.P., Vaidya B.K., Desai K.M. et al. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 36, N 5. – P. 747–756.
12. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – 45, N 3. P. 272–278.
13. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. and Microbiol. – 2010. – 46, N 6. – P. 599–606.
14. Rooney A.P., Price N.P.J., Ray K.J., Kuo T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strain from a biodiesel facility // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – 295, N 1. – P. 82–87.
15. Rywinska A., Rymowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 37, N 5. – P. 431–435.
16. Silva S.N.R.L., Farias C.B.B., Rufino R.D. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – 79, N 1. – P. 174–181.
17. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the bioethanol industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – 18, N 3. – P. 213–219.
18. Yu K.O., Kim S.W., Han S.O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate // J. Bacteriol. – 2010. – 150, N 2. – P. 209–215.
19. Zhu Y., Li J., Tan M. et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-producing *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source // Biores. Technol. – 2010. – 121, N 22. – P. 8902–8906.

Отримано 16.11