

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог, д-р біол. наук
Н.А. Гриценко, асп.
Д.В. Яцук, магістрант
О.О. Боровик, магістрант
Національний університет
харчових технологій

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII* K-8 НА ГЛІЦЕРИНІ

Встановлено, що найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на гліцерині спостерігаються за умови використання нітрату натрію як джерела азотного живлення і посівного матеріалу, вирощеного до середини експоненційної фази росту на середовищі з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину, 0,5 г/л NaNO_3 , 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу та 0,001 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, умови культивування, біосинтез, *Nocardia vaccinii*, гліцерин, спосіб підготовки інокуляту

На сьогодні переробка промислових відходів з використанням мікроорганізмів привертає до себе все більше і більше уваги. Це пов'язано як із загостренням екологічної ситуації на планеті, так і з низькою собівартістю таких відходів (порівняно з традиційними субстратами — глюкозою, лактозою, етанолом тощо) і можливістю використання їх великих кількостей без значних витрат. Виробництво біодизелю з рослинних олій або тваринних жирів супроводжується утворенням гліцерину. Донедавна попит на цей продукт був великим, що зумовлювало його майже повну ліквідність. Проте з ростом виробництва біодизелю гліцерин перейшов у категорію відходів. Неможливість використання в інших технологіях величезної кількості гліцерину, є дотепер найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі [6].

Одним із шляхів утилізації гліцерину може бути використання його як джерела вуглецю і енергії при розробці технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів. На теперішній час вченими всього світу (США, Південна Корея, Бразилія, Німеччина, Франція та ін.) проводяться інтенсивні дослідження з мікробного перетворення гліцерину у важливі сполуки (1,3-пропандіол, дигідроксиацетон, органічні кислоти — сукцинат, пропіонат, цитрат, пігменти тощо) [5]. Є у літературі й повідомлення про використання гліцерину для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР), наприклад, рамноліпідів [2] і манозилеритритолліпідів [4].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено можливість використання гліцерину як субстрату для синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями штамом *Nocardia vaccinii* K-8 [1]. Рівень синтезу цих сполук залежав від концентрації гліцерину і наявності факторів росту у поживному середовищі.

Важливим фактором, що впливає на ефективність технологій мікробного синтезу, у тому числі й мікробних ПАР, є природа і концентрація джерела азотного живлення, а також якість інокуляту [2].

У зв'язку з викладеним вище мета даної роботи — дослідити вплив джерела азоту та способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* K-8 на гліцерині.

Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,0; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 г/л.

© Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Яцук Д.В., Боровик О.О., 2012

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин — 0,5 % (об'ємна частка).

У процесі дослідження впливу природи джерела азоту на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 нітрат натрію був замінений еквімолярно за азотом концентрацією KNO_3 , NH_4NO_3 та $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. У одному з варіантів концентрація нітрату натрію у середовищі для одержання інокуляту становила 0,5 г/л.

Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % гліцерину. Кількість посівного матеріалу становила 5–15 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 96–168 год.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР*, індекс емульгування $E_{2,4}$) визначали як описано у праці [1].

Переважаюча більшість мікроорганізмів засвоює азот в відновленій формі (солі амонію, сечовина, органічні сполуки). Окиснені форми азоту (головним чином нітрати) також використовуються мікроорганізмами, але оскільки азот у конструктивному метаболізмі використовується в формі амонію, нітрати перед включенням в органічні сполуки повинні відновитися за допомогою відповідних ферментних систем (асиміляційна нітратредукція). Під час дослідження впливу природи джерела азоту на синтез ПАР штамом К-8 середовище містило різні мінеральні джерела азоту, серед яких були як нітрати, так і солі амонію.

Результати показали (табл. 1), що оптимальним джерелом азоту для росту та синтезу поверхнево активних речовин штамом *N. vaccinii* К-8 є нітрат натрію.

Варто зазначити, що й літературні дані свідчать про те, що найсприятливішим джерелом азоту для синтезу ПАР бактеріями роду *Nocardia* (щоправда, на гексадекані) також є нітрат натрію [3].

Звертає на себе той факт, що за використання як джерела азотного живлення нітрату калію умовна концентрація ПАР суттєво (у 1,6 разів) знижувалася порівняно з показниками синтезу на середовищі, що містило нітрат натрію (див. табл. 1). Раніше таке явище ми спостерігали під час встановлення оптимальних умов синтезу ПАР у процесі культивування штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані. Як показали ензиматичні дослідження, катіони калію є інгібіторами алкангідроксилази і НАДФ⁺-залежної альдегіддегідрогенази, а катіони натрію — активаторами цих ферментів у штаму ЕК-1. Зниження у середовищі з гексадеканом концентрації K^+ до 1 мМ, підвищення вмісту Na^+ до 35 мМ, внесення 36 мкмоль/л Fe^{2+} , необхідного для функціонування алкангідроксилази, супроводжувалось збільшенням активності ферментів метаболізму гексадекану, а також підвищенням у 4 рази кількості синтезованих ПАР. Не виключено, що катіони калію й у *N. vaccinii* К-8 є інгібіторами ключових ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин.

Таблиця 1. Вплив природи джерела азоту на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 у процесі росту на гліцерині

Джерело азоту	Показники процесу	
	ПАР*	Біомаса, г/л
NaNO_3	4,2±0,12	1,2±0,06
KNO_3	2,6±0,09	1,0±0,05
NH_4NO_3	1,2±0,7	0,3±0,01
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	1,7±0,8	0,3±0,01

Примітки. Концентрація гліцерину у середовищі 0,5 %. Посівний матеріал вирощений мінеральному середовищі з 0,5 % гліцерину з внесенням іонів заліза та дріжджового екстракту.

БИОТЕХНОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ

Відомо, що тривалість лаг-фази під час періодичного культивування мікроорганізмів залежить від якості використовуваного посівного матеріалу. Якщо джерела вуглецю і енергії у новому середовищі відрізняються від тих, що були у попередній культурі, то пристосування (адаптація) до нових умов може бути зумовлена синтезом нових ферментів, які раніше були непотрібні і тому не синтезувалися, що неминуче призводить до подовження процесу біосинтезу.

Раніше [1] було показано, що *N. vaccinii* К-8 є ауксотрофом. Для росту і синтезу поверхнево-активних речовин штам К-8 потребує наявності у середовищі дріжджового екстракту і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, а мікроелементи, в свою чергу, інгібують ці процеси. У попередніх дослідженнях використовували рідкий посівний матеріал з експоненційної фази, вирощений на мінеральному середовищі з гліцерином без внесення будь-яких факторів росту.

Тому на наступному етапі ми досліджували вплив дріжджового екстракту і сульфату заліза у середовищі для одержання інокуляту на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8. Оскільки тривалість одержання інокуляту приблизно удвічі нижча, ніж для біосинтезу ПАР, припустили, що концентрацію джерела азоту у середовищі для одержання посівного матеріалу можна зменшити.

На рисунку наведено криві росту *N. vaccinii* К-8 залежно від концентрації нітрату натрію і дріжджового екстракту у середовищі культивування. У середовища, що містили дріжджовий екстракт, вносили також і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Як видно з наведених на рисунку даних, незалежно від концентрації азоту та наявності у середовищі дріжджового автолізу, початок, середина і кінець експоненційної фази росту припадає на 24, 48 і 72 год відповідно. У разі культивування штаму К-8 на середовищі, в якому присутні фактори росту, а концентрація нітрату натрію становить 0,5 г/л, рівень біомаси на 96 год росту був найвищим (0,9 г/л).

З даних, наведених на рисунку і у табл. 2 видно, що наявність у середовищі культивування факторів росту позитивно впливає не тільки на ріст бактерій, а й на синтез поверхнево-активних речовин. Концентрація біомаси у разі вирощування штаму К-8 на середовищах 1 і 2 є практично однаковою (див. рисунок), проте на середовищі 1 досягається вищий показник умовної концентрації ПАР (табл. 2). Саме тому середовище 1 було прийнято за оптимальне для одержання посівного матеріалу.

Таблиця 2. Вплив концентрації джерела азоту і дріжджового екстракту на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 у процесі росту на гліцерині

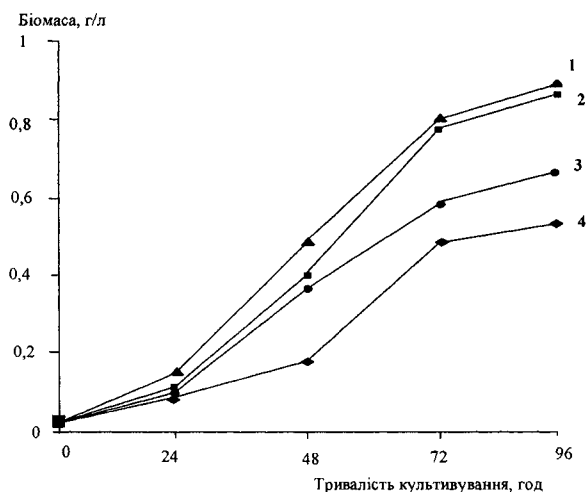
№	Концентрація NaNO_3 , г/л	Дріжджовий екстракт, %	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г/л	ПАР*
1	0,5	0,5	0,001	1,9±0,06
2	1	0,5	0,001	1,5±0,05
3	0,5	0	0	1,1±0,35
4	1	0	0	1,0±0,03

Примітки. Культивування здійснювали упродовж 96 год. Концентрація гліцерину у середовищі 0,5 %. Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на ГКА.

Синтез ПАР залежить не тільки від фізіологічного стану інокуляту, а й від концентрації посівного матеріалу. У зв'язку з цим на останньому етапі досліджень визначали оптимальну для утворення ПАР *N. vaccinii* К-8 концентрацію інокуляту. У даних експериментах використовували посівний матеріал з середини експоненційної фази росту. Ефективність використання інокуляту саме у такому фізіологічному стані для синтезу ПАР штамом К-8 було встановлено раніше [1].

Як свідчать дані, наведені у табл. 3, максимальне значення умовної концентрації ПАР спостерігалось у разі застосування 10 % посівного матеріалу, вирощеного

на середовищі з дріжджовим автолізатом і сульфатом заліза. У попередніх дослідженнях [1] було показано, що за використання інокуляту, вирощеного на середовищі з гліцерином без факторів росту, умовна концентрація ПАР також досягає значення 4,0–4,2. Проте у цьому разі вищою була й концентрація біомаси (близько 2 г/л), у той час як за результатами даної роботи — не вище 1,3 г/л (див. табл. 3). Отже, ПАР-синтезувальна здатність (кількість ПАР, синтезованих 1 г біомаси) у 1,5 рази вища за використання інокуляту, одержаного за описаним у даній роботі способом.



Вплив концентрації нітрату натрію і дріжджового екстракту на ріст *N. vaccinii* К-8.

Концентрація нітрату натрію (г/л): 1, 3 — 0,5; 2, 4 — 1,0. Концентрація дріжджового екстракту (% об'ємна частка): 1, 2 — 0,5; 3, 4 — 0. Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на ГКА.

Таблиця 3. Вплив концентрації посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* К-8

Концентрація інокуляту, %	ПАР*	Біомаса, г/л
5	2,7±0,10	0,8±0,06
10	4,2±0,13	1,3±0,08
15	2,6±0,12	1±0,07

Примітки. Культивування здійснювали упродовж 168 год. Середовище для одержання інокуляту і біосинтезу ПАР містило 0,5 % гліцерину, 0,5 % дріжджового екстракту (об'ємна частка) і 0,001 г/л FeSO₄ · 7H₂O.

Висновки. Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що оптимальним джерелом азотного живлення для синтезу поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* К-8 є нітрат натрію. Модифіковано склад поживного середовища для одержання посівного матеріалу (0,5 г/л нітрату натрію, 0,5 % дріжджового екстракту, 0,001 г/л сульфату заліза) і показано, що найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* К-8 на гліцерині досягаються за використання 10 % інокуляту з середини експоненційної фази росту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині // Наукові праці НУХТ. — 2008. — № 25, Ч. I. — С. 107–109.
2. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structure, microbial origins and roles // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86. — P. 1323–1336.

3. 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. — V. 31. — P. 249–253.

4 Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T. et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T // *J. Biosci. and Bioengineer.* — 2007. — V. 104, № 1. — P. 78–81.

5. Paulo G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Advanc.* — 2009. — V. 27. — P. 30–39.

6. Yazdani S.S., Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18. — P. 213–219.

Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко,
Д.В. Яцук, А.А. Боровик

Влияние условий культивирования на синтез поверхностно активных веществ при условии роста *Nocardia vaccinii* К-8 на глицерине

Установлено, что максимальные показатели синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Nocardia vaccinii* К-8 на глицерине наблюдаются при использовании нитрата натрия в качестве источника азотного питания и посевного материала, выращенного до середины экспоненциальной фазы роста на среде, содержащей 0,5 % (по объему) глицерина, 0,5 г/л NaNO_3 , 0,5 % (по объему) жрожжевого автолизата и 0,001 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, условия культивирования, биосинтез, *Nocardia vaccinii*, глицерин, способ подготовки инокулята

T. Pirog, N. Gritsenko,
D. Yatsuk, O. Borovyk

The effect of cultivation conditions on surface-active substances synthesis in *Nocardia vaccinii* К-8 growing on glycerol

Maximal characteristics of the surface-active substances (SAS) synthesis while *Nocardia vaccinii* К-8 growing on glycerol were detected under such conditions: using of sodium nitrate as nitrogen source and inoculum from exponential phase, grown on the medium with 0,5 % (v/v) glycerol, 0,5 g/l NaNO_3 , 0,5 % (v/v) of yeast extract, 0,001 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Key words: surface active substances conditions of cultivation, biosynthesis, *Nocardia vaccinii*, glycerol, preparation of inoculum

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Надійшла до редколегії 22.01.2012 р.