

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

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

тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

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

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛІЦЕРИНІ

Досліджено можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині за присутності цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і C_4 -дикарбонових кислот (фумарат – попередник глюконеогенезу). За спільного внесення органічних кислот на початку стаціонарної фази росту у концентрації 0,1% кількість синтезованих ПАР підвищувалася на 40–45% порівняно з культивуванням на середовищі без фумарату і цитрату. Внесення органічних кислот як у середовище для одержання посівного матеріалу, так і для біосинтезу ПАР не супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Nocardia vaccinii* К-8, гліцерин, цитрат, фумарат.

Поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження, до яких останнім часом прикута увага багатьох науковців, належать до класу амфіпатичних молекул, що складаються як з гідрофобної, так і гідрофільної частини і можуть взаємодіяти з поверхнями різних полярностей та знижувати поверхневий і міжфазний натяги розчинів [2, 10]. Також ПАР здатні сприяти емульгуванню, формуванню біоплівки, утворенню наночастинок, зв'язувати важкі метали, проявляти антимікробні та антиадгезивні властивості [10]. У попередніх дослідженнях було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і показана його здатність синтезувати на гліцерині (відходи виробництва біодизелю) метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями [2, 7]. 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 [9]. У нещодавніх роботах було встановлено можливість синтезу ПАР ліпопептидної приро-



ди *Nocardiosis alba* MSA10 [8] та гліколіпідної природи — *Nocardiosis lucentensis* MSA 04 [10]. Наші дослідження показали, що за хімічною природою ПАР *N. vaccinii* К-8 є сумішшю нейтральних, гліко- та аміноліпідів [7].

Попри різноманітні практичні властивості та переваги перед синтетичними аналогами промислове виробництво ПАР дотепер не реалізовано, а основними стримуючими факторами є високі витрати на біосинтез, виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо високий рівень їх синтезу, тому необхідним є пошук можливих шляхів інтенсифікації біосинтезу ПАР. Одним з таких підходів є внесення у середовище культивування екзогенних попередників, що специфічно залучаються до конструктивного метаболізму та підвищують синтез цільового продукту. Аналізуючи хімічний склад ПАР *N. vaccinii* К-8, ми припустили, що внесенням у середовище з гліцерином цитрату (регулятор синтезу ліпідів) та фумарату (попередник глюконеогенезу) можна підвищити вихід цільового продукту [4].

У зв'язку з цим мета даної роботи — дослідження можливості інтенсифікації біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 на гліцерині за присутності органічних кислот.

Матеріали і методи

Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; 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.

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 (10^4 – 10^5 клітин/мл) становила 10% від об'єму середовища.

Як попередники біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 використовували цитрат та фумарат натрію, які вносили у вигляді 10% розчинів у концентрації 0,01–0,5% (масова частка) на початку процесу культивування та на початку стаціонарної фази росту.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 168 год. Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

- поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини (КР), вимірювали на напівавтоматичному тензіометрі «Lauda TD 1С» (Німеччина);
- умовна концентрація ПАР (ПАР*, безрозмірні одиниці), визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зростання поверхневого натягу на кривій залежності σ_s



від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*;

- кількість синтезованих ПАР (г/л), визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів сумішшю Фолча (хлороформ – метанол 2:1) з супернатанту культуральної рідини. Одержаний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові ИР–1М2 (Росія) при температурі 55 °С та абсолютному тиску 0,4 атм. Для одержання супернатанту КР центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв.

Усі досліди проводили в 3-х повторях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичне опрацювання експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у праці [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У наших попередніх дослідженнях було показано, що внесення цитрату й фумарату у середовище культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 дозволило суттєво інтенсифікувати біосинтез ПАР: так за спільного внесення цитрату (0,1%) і фумарату (0,2%) спостерігали збільшення синтезу ПАР штамом ЕК-1 на 60% (до 6,5–7,0 г/л) [3, 4]. Для штаму К-4 оптимальні концентрації органічних кислот виявилися на порядок нижчими (по 0,01%). За таких умов вдалося підвищити рівень синтезу цільового продукту практично у три рази – на 195% [6].

У ході визначення оптимального моменту внесення попередників у середовище культивування *N. vacciniі* К-8 було встановлено, що додавання як цитрату, так і фумарату (по 0,01–0,05%) на початку культивування не супроводжувалося інтенсифікацією біосинтезу ПАР, а навпаки, проявлявся ефект інгібування (зниження концентрації ПАР на 10–45%), пропорційний кількості внесених попередників. При додаванні цитрату і фумарату на початку стаціонарної фази росту штаму К-8 у концентраціях 0,05% синтез ПАР підвищувався на 10–15%.

На наступному етапі визначали оптимальні концентрації органічних кислот для максимальної інтенсифікації біосинтезу метаболітів з поверхнево-активними властивостями. Враховуючи встановлені раніше для *R. erythropolis* ЕК-1 і *A. calcoaceticus* К-4 концентрації фумарату і цитрату [6], було вирішено проаналізувати вплив органічних кислот у широкому діапазоні концентрацій (0,01–0,5%). Як видно із наведених у табл. 1 даних, оптимальною концентрацією цитрату для штаму К-8 є 0,1%. За таких умов синтез ПАР підвищувався на 36% (за даними вагового методу). Для фумарату найсуттєвіше підвищення синтезу (на 31%) спостерігалось у разі додавання останнього у концентрації 0,2%.

Таблиця 1

Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 від концентрації цитрату і фумарату
Table 1

Dependence of the SAS synthesis of *N. vaccinii* К-8 on citrate and fumarate concentration

Попередник	Концентрація, %	ПАР*	ПАР*, % від контролю	Концентрація ПАР, г/л	Концентрація ПАР, % від контролю
без попередників		2,0±0,1	-	1,72±0,09	-
Цитрат	0,01	2,0±0,1	100	1,65±0,08	96
	0,03	2,1±0,1	105	1,78±0,09	104
	0,05	2,3±0,12	115	1,99±0,1	116
	0,1	2,3±0,12	115	2,35±0,12	137
	0,2	2,2±0,11	110	2,21±0,11	128
	0,3	2,5±0,13	125	2,17±0,11	124
	0,4	2,6±0,13	130	1,85±0,09	108
	0,5	2,4±0,12	120	2,01±0,1	117
Фумарат	0,01	1,9±0,1	95	1,65±0,08	96
	0,03	2,0±0,1	100	1,78±0,09	104
	0,05	2,2±0,11	110	2,00±0,1	116
	0,1	2,1±0,11	105	2,14±0,11	119
	0,2	2,1±0,11	105	2,26±0,11	131
	0,3	2,3±0,12	115	2,18±0,11	127
	0,4	2,5±0,13	125	2,12±0,11	124
	0,5	2,5±0,13	125	1,9±0,09	110
Цитрат + Фумарат	0,1 + 0,1	2,5±0,13	125	2,43±0,13	141
	0,1 + 0,2	2,5±0,13	125	2,41±0,12	140
	0,2 + 0,2	2,3±0,12	115	2,16±0,11	126

За спільного внесення цитрату (0,1%) та фумарату (0,1%) спостерігали підвищення концентрації ПАР на 41% (табл. 1). Зі збільшенням концентрації фумарату (до 0,2%) кількість синтезованих ПАР практично не змінювалася (40%), а у разі підвищення концентрації цитрату до 0,2% синтез ПАР знижувався, що може свідчити про інгібування активності ферментів його надлишком.



Встановлено, що внесення органічних кислот у середовище для одержання посівного матеріалу супроводжувалося підвищенням концентрації біомаси, проте не ПАР (табл. 2.).

Стимулювальну дію цитрату натрію на синтез ПАР мікроорганізмами було встановлено ще у 80–90-х роках ХХ ст.; так при внесенні даної кислоти у середовище культивування *Bacillus subtilis* спостерігалось підвищення біосинтезу сурфактину із одночасним зниженням ізоцитрат-дегідрогеназної активності, що може свідчити про спрямованість потоку вуглецю субстрату на процеси конструктивного метаболізму, тобто на синтез ПАР. Для дріжджів *Torulopsis apicola* – продуцента поверхнево-активних гліколіпідів встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтриманні значення рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлучнення культуральної рідини в результаті транспорту цитрату симпортом з протоном, що й забезпечувало збільшення синтезу ПАР [6].

Оскільки ПАР *N. vaccinii* К-8 є комплексом нейтральних, аміно- і гліколіпідів [7], ми припустили, що як і для штаму *R. erythropolis* ЕК-1 [2] можна підвищити синтез поверхнево-активних речовин веденням у середовище фумарату і цитрату. Фумарат, як і інші C₄-дикарбонові кислоти, є попередником глюконеогенезу, що забезпечує синтез вуглеводів, а отже й гліколіпідів (трегалозоміколатів). Стимулюючий вплив пояснюють активуючим впливом цитрату на ензим ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, й ПАР ліпідної природи [4].

Таблиця 2

Вплив способу одержання інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* К-8

Table 2

Effect of inoculum preparation on the SAS synthesis of *N. vaccinii* К-8

Концентрація органічних кислот у середовищі, %		ПАР*	ПАР*, % від контролю	Концентрація ПАР, г/л	Концентрація ПАР, % від контролю	Біомаса, г/л
для одержання інокуляту	для біосинтезу					
0	0	2,0±0,1	-	1,72±0,09	-	1,0±0,05
0	цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	2,5±0,13	125	2,41±0,12	140	1,0±0,05
цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	0	1,8±0,09	90	1,65±0,08	96	1,3±0,07
цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	2,3±0,12	115	2,10±0,11	122	1,4±0,07



Результати наших досліджень різняться також і від відомих літературних даних. По-перше, у літературі описано збільшення синтезу ПАР за наявності у середовищі тільки цитрату, який вносили на початку культивування [6]. По-друге, оптимальна концентрація цитрату при цьому становила 0,5–1,0%. За такої концентрації цитрат можна розглядати не як регулятор синтезу ліпідів, а як додатковий ростовий субстрат. По-третє, нам не вдалося знайти у літературі відомостей про підвищення синтезу ПАР за наявності як цитрату, так і C_4 -дикарбонових кислот.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсифікація біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 спостерігалася за умови внесення органічних кислот у середовище з гліцерином на початку стаціонарної фази росту. За спільного внесення 0,1% цитрату і 0,1% фумарату кількість синтезованих ПАР підвищувалася на 40–45%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
2. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15–24.
3. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.О. Роль экзогенных попередників в утворенні поверхнево-активних речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі // Микробиол. журнал. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 11–18.
4. Пирог Т.П., Тарасенко Д.А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. — 2008. — № 3. — С. 48–55.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.М.. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58–63.
6. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: «Наукова думка», 2010. — 327 с.
7. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15–24.
8. Gandhimathi R., Kiran G.S., Hema T.A., Selvin J. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10 // Bioprocess Biosyst. Eng. — 2009. — Vol. 32. — P. 825–835.
9. 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.
10. Kiran G.S., Thomas T.A., Selvin J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation // Colloids Surf. B Biointerfaces. — 2010. — Vol. 78. — P. 8–16.



УДК 759.873.088.5:661.185

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

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина,
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

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

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ УСЛОВИИ РОСТА *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛИЦЕРИНЕ

Реферат

Исследована возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* К-8 на глицерине в присутствии цитрата (регулятор синтеза липидов) и C₄-дикарбоновых кислот (фумарат — предшественник глюконеогенеза). При одновременном внесении органических кислот в начале стационарной фазы роста в концентрации 0,1% количество синтезированных ПАВ возрастало на 40–45% в сравнении с культивированием на среде без фумарата и цитрата. Внесение органических кислот как в среду для получения посевного материала, так и для биосинтеза ПАВ не сопровождалось увеличением синтеза ПАВ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Nocardia vaccinii* К-8, глицерин, цитрат, фумарат.

UDK 759.873.088.5:661.185

D.I. Khomyak¹, N.A. Grycenko¹, A.D. Konon¹, T.P. Pirog^{1,2}

¹National University of Food Technologies,
68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,
tel.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

²Institute of Microbiology and Virology NASU,
154, Academic Zabolotny str., Kyiv GSP, D 03680, Ukraine

INFLUENCE OF ORGANIC ACIDS ON THE SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES UNDER THE CONDITIONS OF GROWTH OF *NOCARDIA VACCINII* K-8 ON GLYCEROL

Summary

It was investigated the possibility of intensification of the synthesis of surface-active substances (SAS) of *Nocardia vaccinii* K-8 on glycerol in the presence of citrate (the lipid synthesis regulator) and C₄-bicarbonic



acids (fumarate – the precursor of gluconeogenesis). The simultaneous addition of organic acids in concentration of 0.1% at the beginning of stationary growth phase led to 40–45% increase of the SAS quantity in comparison to the growth on the medium without citrate and fumarate. The addition of organic acids both into the medium appointed for preparing of the inoculum and for biosynthesis of SAS didn't result in increase of SAS concentration.

Key words: surfactants, *Nocardia vaccinii* K-8, glycerol, citrate, fumarate.

Одержано 28.02.2012.

