

Д.В. Яцук, магістрант

Н.А. Гриценко, аспірант

Т.П. Пирог, доктор біол. наук

D. Yatsuk, N. Grytsenko, T. Pirog

**ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ МАТЕМАТИЧНОГО ПЛАНУВАННЯ
ДЛЯ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛІЦЕРИНІ**

**THE USE OF MATHEMATICAL PLANNING METHODS FOR
INTENSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES SYNTHESIS BY
NOCARDIA VACCINII K-8 ON GLYCEROL**

*За допомогою математичних методів планування експерименту оптимізовано поживне середовище для культивування *Nocardia vaccinii* К-8 – продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР). Встановлено, що за умов росту штаму К-8 на середовищі, що містить 0,5 г/л NaNO_3 ; 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового екстракту та 1,5 % (об'ємна частка) гліцерину кількість синтезованих ПАР підвищується майже у 4 рази (до 12,6 г/л) порівняно з показниками до оптимізації.*

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, однофакторний експеримент, план повного факторного експерименту, інтенсифікація синтезу*

*Using mathematical planning methods in experiments the nutrient medium for cultivation of *Nocardia vaccinii* K-8 – the surface-active substances (SAS) producer – was optimized. It was determined that during the cultivation of strain K-8 on the medium containing 0,5 g/l of NaNO_3 ; 0,5 % (v/v) of yeast extract and 1,5 % (v/v) of*

glycerol the SAS synthesized amount was increased in about 4 times (up to 12.6 g/l) comparing to the indexes obtained before optimization.

Key words: surface-active substances, one factorial experiment, the plan of full factorial experiment, the synthesis intensification

Поверхнево-активні речовини (ПАР) належать до класу амфіпатичних молекул, що складаються з двох частин: полярної (з основною гідрофільною групою) і неполярної (з гідрофобним залишком). Завдяки такій будові молекул розчинам ПАР притаманна здатність до зниження поверхневого, міжфазного натягу і до емульгування. Такі властивості дають змогу використовувати ПАР у нафтохімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості, сільському господарстві та медицині [6]. При цьому мікробні ПАР мають ряд переваг перед синтетичними аналогами, зокрема характеризуються біодеградабельністю і нетоксичністю.

У попередніх дослідженнях із забрудненою нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і показана його здатність синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями [1].

Оскільки промислове виробництво мікробних ПАР стримується певними факторами (наприклад, високі витрати на сировину, низька концентрація цільового продукту), наступні дослідження були спрямовані на підвищення ефективності технології. Так, було встановлено здатність штаму К-8 синтезувати поверхнево-активні речовини за умов росту на гліцерині, який є дешевим ростовим субстратом – відходом виробництва біодизелю [2]. Оптимізацію середовища культивування штаму К-8 здійснювали за допомогою комплексу однофакторних досліджень, проте концентрація цільового продукту залишалася недостатньо високою. Так, максимальний показник умовної концентрації ПАР*, отриманий в однофакторних експериментах, не перевищував 4,0–4,2 г/л [2].

З літератури відомо [4, 5], що застосування методів математичного планування є ефективним методом для підвищення синтезу цільового продукту. Математичні методи дають змогу звести до мінімуму випадкові помилки в експериментах, кількісно оцінити вплив кожного окремого компонента середовища на вихід цільового продукту, а також дослідити взаємовплив усіх компонентів.

У зв'язку з цим мета даної роботи – інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин під час росту *N. vaccinii* К-8 на гліцерині за допомогою математичних методів планування.

Культивування бактерій здійснювали на базовому рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 1,0; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; рН 6,8–7,0. У дослідженнях використовували варіанти середовища, в якому концентрація NaNO_3 становила 0,5 та 1,5 г/л. Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин в концентрації 0,5–3,5 % (об'ємна частка). У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат у концентрації 0,15–0,5 г/л, а також $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 г/л. В одному з варіантів у середовище додатково вносили цитрат натрію (0,1 %, масова частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (72 год культивування), вирощену на базовому середовищі наведеного складу з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину, 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,001 г/л $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Кількість посівного матеріалу становила 10 % 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 168 год.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за показниками поверхневого натягу, умовної концентрації ПАР (ПАР*, безрозмірні одиниці), кількості утворених ПАР (г/л), які визначали як описано раніше [1, 2].

Дослідження з визначення складу поживного середовища здійснювалися за схемою повного факторного експерименту (ПФЕ) 2^3 , що включав план за кожним фактором (компонент середовища), який являв собою мінімальні та

максимальні його концентрації. Аналіз результатів здійснювався за алгоритмом Ієтса з використанням формул, наведених у практикумі [3].

У попередніх дослідженнях [2] за допомогою однофакторних експериментів було визначено значимі для росту і синтезу цільового продукту компоненти поживного середовища: джерело вуглецю та енергії (гліцерин), джерело азоту (NaNO_3) та дріжджовий екстракт (джерело факторів росту).

Під час постановки першого комплексу експериментів важливо правильно підібрати концентрації компонентів середовища від меж, що лімітують синтез цільового продукту, до меж, які його інгібують (табл.1).

Результати експериментальних досліджень показані за допомогою матриці композиційного плану повного факторного експерименту 2^3 (табл. 2). У ній наведено всі можливі комбінації трьох факторів на двох рівнях (нижньому та верхньому).

Як видно з наведених у табл. 2 даних, найвища концентрація ПАР* спостерігалася у варіанті № 6, в якому концентрації гліцерину та дріжджового екстракту була на вищому рівні, у той час як концентрація нітрату натрію – на нижчому. Зазначимо, що найвищі значення показника ПАР* спостерігалися у тих варіантах, в яких концентрація джерела азоту перебувала на нижчому рівні.

Таблиця 1

Концентрації компонентів поживного середовища для синтезу ПАР

N. vaccinii K-8 (перший етап) у плані ПФЕ 2^3

№	Досліджуваний фактор	Рівні досліджуваних факторів		
		-1	0	+1
1	Гліцерин (%), x_1	0,5	1	1,5
2	NaNO_3 (г/л), x_2	0,5	1	1,5
3	Дріжджовий екстракт (г/л), x_3	0,15	0,2	0,25

Результати реалізації дослідів за планом ПФЕ 2³ (перший етап)

№	Рівні факторів			ПАР*
	Гліцерин	NaNO ₃	Дріжджовий екстракт	
1	-1	-1	-1	2,2±0,08
2	+1	-1	-1	4,5±0,11
3	-1	+1	-1	1,6±0,06
4	+1	+1	-1	3,1±0,09
5	-1	-1	+1	3,7±0,1
6	+1	-1	+1	4,8±0,12
7	-1	+1	+1	1,9±0,05
8	+1	+1	+1	3,3±0,07

Математична обробка отриманих даних показала значущість усіх компонентів, включених до складу поживного середовища, а рівняння регресії (1) дало змогу зробити висновки про рівень їхніх оптимальних концентрацій:

$$y=25,1+ 6,3x_1-5,3x_2+2,3x_3-1,3x_1x_2 \quad (1)$$

Коефіцієнти у рівнянні регресії (1) певною мірою характеризують процес біосинтезу. Так, якщо коефіцієнт зі знаком «-», то підвищення концентрації відповідного фактору призведе до зниження кількості синтезованого цільового продукту, а у разі знаку «+» збільшення концентрації цього фактора супроводжуватиметься підвищенням кількості ПАР.

Базуючись на висновках, зроблених за допомогою першої серії дослідів, ми встановили нові концентрації факторів (табл. 3). Дані, наведені у табл. 3, засвідчують, що на наступному етапі досліджень концентрацію джерела азоту потрібно залишити на попередньому рівні, а концентрацію двох інших факторів збільшити. Результати другої серії дослідів наведено у табл. 4.

Таблиця 3

**Концентрації компонентів поживного середовища для синтезу ПАР
N. vaccinii К-8 (другий етап) у плані ПФЕ 2³**

№	Досліджуваний фактор	Рівні досліджуваних факторів		
		-1	0	+1
1	Гліцерин (%), x_1	1,5	2,5	3,5
2	NaNO ₃ (г/л), x_2	0,5	1	1,5
3	Дріжджовий екстракт (г/л), x_3	0,3	0,4	0,5

Таблиця 4

Результати реалізації дослідів за планом ПФЕ 2³ (другий етап)

№	Рівні факторів			
	Гліцерин	NaNO ₃	Дріжджовий екстракт	ПАР*
1	-1	-1	-1	5,2±0,13
2	+1	-1	-1	3,6±0,08
3	-1	+1	-1	4,2±0,1
4	+1	+1	-1	3,7±0,07
5	-1	-1	+1	4,8±0,11
6	+1	-1	+1	3,5±0,06
7	-1	+1	+1	4,1±0,09
8	+1	+1	+1	3,1±0,07

Як видно з наведених у табл. 4 даних, найвищий результат (умовна концентрація ПАР 5,2) спостерігався у першому варіанті, в якому концентрації усіх факторів були на нижчому рівні. Аналіз рівняння регресії (2) показав, що найбільший вплив на процес спричиняють концентрації гліцерину та нітрату

натрію:

$$y=32,2 - 4,4x_1 - 2x_2 + 1,4x_1x_2 \quad (2)$$

Аналіз рівняння регресії (2) свідчить також, що вищі показники синтезу ПАР будуть спостерігатися у разі, якщо концентрація гліцерину і нітрату натрію перебуватимуть на нижчому рівні. Дане рівняння регресії не описує залежності синтезу ПАР від концентрації дріжджового екстракту, проте оскільки найвищий результат спостерігався у варіанті, в якому концентрація екстракту становить 0,3 (найнижчий рівень) можна зробити відповідний висновок про його вміст у середовищі культивування штаму К-8.

Дані, наведені у табл. 2 і 4, показують ефективність математичних методів планування експерименту. Так, найбільший показник умовної концентрації ПАР*, отриманий у однофакторних дослідженнях (4,2), є нижчим порівняно з результатами експериментів, в яких застосовувалися математичні методи планування. Зокрема, на першому етапі, коли концентрації факторів було обрано на основі теоретичних міркувань і результатів однофакторних експериментів, вдалося підвищити показник ПАР* до 4,8, а вже на другому, де межі концентрацій факторів встановлено за допомогою рівняння регресії, умовна концентрація ПАР становила 5,2. Таким чином, використання математичних методів планування експерименту дало змогу збільшити умовну концентрацію ПАР на 23 % порівняно з результатами однофакторних досліджень.

У процесі оптимізації умов культивування *N. vaccinii* К-8 ми встановили таку закономірність: у більшості експериментів умовна концентрація ПАР підвищувалася, але при цьому і значення поверхневого натягу супернатанту культуральної рідини також збільшувалося порівняно з показниками, одержуваними раніше у однофакторних дослідженнях. Ми припустили, що це явище може бути зумовлене такою причиною. Мікроорганізми-продуценти ПАР зазвичай синтезують комплекс різних поверхнево-активних речовин (гліко-, аміно-, фосфо- та нейтральні ліпіди, жирні кислоти), склад яких змінюється залежно від умов культивування [2]. Цілком ймовірно, що

встановлені нами умови культивування штаму К-8 виявилися сприятливими для синтезу певного компонента ПАР з відповідними властивостями (зокрема, за таких умов можуть переважно синтезуватися жирні кислоти, які знижують поверхневий натяг незначно порівняно, наприклад, з гліколіпідами). Виясненню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Отже, використання для оцінки синтезу ПАР показника умовної концентрації поверхнево-активних речовин не завжди може бути коректним і у певних випадках повинно бути підтверджене іншими критеріями. У зв'язку з цим на наступному етапі як показник синтезу цільового продукту використовували кількість синтезованих ПАР (г/л), що визначається ваговим методом після попередньої екстракції органічними розчинниками поверхнево-активних речовин з супернатанту культуральної рідини.

У даних експериментах ми перевіряли концентрацію гліцерину у середовищі культивування штаму К-8, встановлену з використанням математичних методів планування, а також досліджували вплив цитрату натрію на синтез ПАР (табл. 5). Позитивний ефект від внесення цитрату натрію зумовлений його активуючим впливом на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, що каталізує перетворення ацетил-КоА у малоніл-КоА, що в свою чергу супроводжується збільшенням синтезу жирних кислот, а відповідно, й ліпідних ПАР.

Дані, наведені у табл. 5, є дуже цікавими для роздумів. По-перше, вони підтверджують, що концентрація гліцерину, визначена за допомогою математичних методів планування експерименту, є оптимальною. По-друге, кількість ПАР (г/л, табл. 5) значно вища, ніж показники умовної концентрації ПАР, визначені у попередніх експериментах (див. табл. 2 і 4). Отже, концентрація синтезованих ПАР є достатньо високою (і кількісний метод дає змогу її визначити), а от показник умовної концентрації ПАР оцінює кількість цільового продукту неадекватно. І, нарешті, дані табл. 5 свідчать, що цитрат негативно впливає на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8. Такі результати виявилися несподіваними, оскільки за літературними і власними експериментальними

**Вплив концентрації гліцерину та цитрату
на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8**

Концентрація гліцерину, %	Концентрація цитрату, %	Концентрація ПАР, г/л	Вихід ПАР від заданого субстрату, %
1,5	0,1	9,63±0,21	51±2,5
	0	12,60±0,24	67±3,3
2,0	0,1	7,80±0,19	31±1,5
	0	12,25±0,22	49±2,4
2,5	0,1	7,63±0,18	24±1,2
	0	12,32±0,23	39±2,0

Примітки. Концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих штамом К-8 на вихідному (неоптимізованому) середовищі з гліцеином становила 3,2 г/л. Цитрат вносили у середовище на початку процесу культивування.

даними, одержаними раніше для продуцентів ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, цитрат є позитивним регулятором синтезу ліпідів у мікроорганізмів. Дослідження цього питання буде предметом нашої подальшої роботи. Ми припускаємо, що цитрат може спричинити позитивний вплив на синтез ПАР за умови його внесення у середовище культивування штаму К-8 не на початку процесу, а наприкінці експоненційної фази росту. Крім того, цілком ймовірно, що у даних експериментах використовували неоптимальну концентрацію цієї органічної кислоти.

Висновки. Отже, проведений комплекс досліджень дав змогу впевнитися в ефективності математичних методів планування експерименту, використання яких дозволило збільшити у 4 рази кількість синтезованого цільового продукту. Найвищі показники синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 спостерігалися за внесення в середовище культивування 0,5 г/л NaNO₃, 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового екстракту та 1,5 % (об'ємна частка) гліцерину.

Список літератури

1. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Штам бактерій *Nocardia vaccinii* К-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин // Харчова промисловість. – 2008. – №7. – С. 29–32.
2. 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.І. – С. 107–109.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: АCADEMIA, 2005. – 604 с.
4. Bhalchandra K., Snehal R. M., Renuka M. J. Enhanced production of amidase from *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 by medium optimisation using a statistical experimental design // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol.36. – P. 671–678.
5. Ram S. S., Harpreet S., Gaganpreet K. S. Response surface optimization of the critical medium components for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* FB-1 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 152. – P: 42–53.
6. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25. – P. 99–121.

Надійшла до редколегії 08 червня 2010 р.