

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Н.А. Манжула, магістрант

Національний університет харчових технологій

ШТАМ БАКТЕРІЙ *NOCARDIA VACCINII* K-8 ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ПРОДУЦЕНТ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

*Показана можливість синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями під час культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на дешевих мінеральних середовищах з гідрофільними субстратами (етанол, глюкоза). Встановлено, що синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) підвищується за концентрації субстратів 1 %, тривалості культивування 120–168 год і наявності у середовищі іонів заліза та дріжджового автолізу. Одержані дані є вихідними для розробки технології синтезу ПАР *Nocardia vaccinii* K-8.*

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, емульгувальні властивості, культивування, біосинтез, *Nocardia vaccinii**

*Показана возможность синтеза метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами при культивировании *Nocardia vaccinii* K-8 на дешевых минеральных средах с гидрофильными субстратами (этанол, глюкоза). Установлено, что синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) повышается при концентрации субстратов 1 %, длительности культивирования 120–168 ч и наличии в среде ионов железа и дрожжевого автолизата.*

Полученные данные являются исходными для разработки технологии синтеза ПАВ *Nocardia vaccinii* K-8.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, эмульгирующие свойства, культивирование, биосинтез, *Nocardia vaccinii*

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків води і ґрунту нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* EK-1, *Mycobacterium sp.* K-2 [2]. Всі штами характеризувалися здатністю до асиміляції вуглеводневих субстратів (нафта, рідкі парафіни, гексадекан), причому ступінь утилізації цих гідрофобних сполук підвищувався за умови іммобілізації бактеріальних клітин. Встановлено можливість очищення забрудненої нафтою води (100-200 мг/л) на модельній установці з іммобілізованими на керамзиті клітинами *Rhodococcus erythropolis* EK-1 та *Nocardia vaccinii* K-8 за високої швидкості подачі води (до 0,68 л/хв) та в умовах низької аерації (до 0,1 л повітря/л води за хв). Ступінь очищення води від нафти підвищувався за періодичної подачі 0,01 % діамонійфосфату та становив 99,5–99,8 % [2].

Відомо, що здатність до асиміляції вуглеводневих субстратів у мікроорганізмів часто зумовлена синтезом поверхнево-активних речовин (ПАР) [3, 5, 6]. Так, раніше нами було встановлено здатність до утворення ПАР штаму *Rhodococcus erythropolis* EK-1, визначено шляхи підвищення синтезу цих сполук під час росту бактерій на гексадекані [1].

Слід зазначити, що літературні дані щодо синтезу ПАР представниками роду *Nocardia* є досить обмеженими. Так, відомо, що штам *Nocardia sp.* L-417 за умов росту на гексадекані синтезує комплекс речовин з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями [4]. Крім того, у літературі відсутні відомості про синтез ПАР у процесі росту мікроорганізмів на етанолі.

У зв'язку з цим мета даної роботи – дослідження синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* K-8 у процесі росту на гідрофільних і гідрофобних субстратах.

Культивування бактерій проводили на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): **середовище 1:** KH_2PO_4 – 6,8; NaOH – 1,0; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, pH 6,8–7,0. **Середовище 2:** KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, pH 6,8–7,0. **Середовище 3:** 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; pH 6,8–7,0.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гексадекан в концентрації 2 % (об'ємна частка), етанол в концентрації 1 та 2 % (об'ємна частка), глюкозу – 1 та 2 % (масова частка), рідкі парафіни (*n*-алкани C_{10} – C_{16}) – 2 % (об'ємна частка).

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30 °C упродовж 72 – 168 год.

В одному з варіантів *N. vaccinii* K-8 культивували на середовищах 2 і 3, в які додатково вносили (окремо і разом) дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів [1] або $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 г/л.

Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на м'ясо-пептонному агарі (МПА), глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту (72 год культивування), вирощену на середовищах 2 і 3 з 0,5 % (об'ємна частка) етанолу і 0,5 % (масова частка) глюкози. Кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища.

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху масу клітин за калібрувальним графіком.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1) поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, який вимірювали за допомогою платинової і скляної пластинки за методом Вільгельмі;

2) для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини у точці зниження поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається у безрозмірних одиницях;

3) індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини (нативної і розбавленої у 10 і 50 раз) , який визначали за методом, описаним у праці [1]. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Утворення ПАР, як і інших продуктів мікробного синтезу, залежить від умов вирощування продуцента, зокрема, природи і концентрації джерел вуглецевого і азотного живлення, співвідношення C/N, рН, температури, тривалості культивування та інших факторів [1, 3, 5, 7]. Показники синтезу ПАР у процесі вирощування *N. vaccinii* К-8 на середовищах з різними джерелами вуглецевого живлення наведено у табл. 1. Як видно з наведених у табл. 1 даних, синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 залежить від складу поживного середовища, природи і концентрації джерела вуглецевого живлення. Найвищі значення ПАР* було зафіксовано у процесі вирощування бактерій на всіх середовищах з етанолом як джерелом вуглецю та енергії. Вищі значення індексу емульгування було встановлено для культуральної рідини, одержаної після культивування штаму на середовищах з глюкозою.

У подальших дослідженнях штам *N. vaccinii* К-8 вирощували на гідрофільних субстратах, що було зумовлено такими причинами. По-перше, ці сполуки є водорозчинними, і отже, технологічнішими порівняно з гідрофобними субстратами. По-друге, етанол і глюкоза є значно

Синтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* K-8 на середовищах різного складу

Середовище	Джерело вуглецю та енергії	Показники процесу			
		pH кінцеве	Біомаса, г/л	ПАР*	E ₂₄ , %
1	Гексадекан	6,8±0,3	0,2±0,01	0,7±0,03	49±2,4
	Рідкі парафіни	6,8±0,3	0,25±0,01	0,5±0,02	100±4,5
	Етанол	6,75±0,2	0,25±0,01	1,0±0,05	50±2,5
	Глюкоза	6,5±0,2	1,25±0,06	0,7±0,03	100±4,5
2	Гексадекан	7,6±0,3	0,25±0,01	0,7±0,03	50±2,5
	Рідкі парафіни	7,7±0,3	0,2±0,01	0,7±0,03	70±3,5
	Етанол	7,6±0,3	1,0±0,05	1,0±0,05	60±3,0
	Глюкоза	6,7±0,3	0,5±0,02	1,0±0,05	100±4,5
3	Гексадекан	7,09±0,3	0,3±0,01	1,0±0,05	46±2,3
	Рідкі парафіни	7,4±0,3	0,3±0,01	0,7±0,03	50±2,5
	Етанол	7,6±0,3	0,5±0,02	1,0±0,05	45±2,2
	Глюкоза	7,6±0,3	0,72±0,03	0,7±0,03	73±3,6

Примітки. Концентрація гексадекану, рідких парафінів, етанолу – 2 % (об'ємна частка), глюкози – 2 % (масова частка). Посівний матеріал вирощений на МПА. Тривалість культивування – 120 год. Емульгувальні властивості визначали для нативної культуральної рідини.

дешевшими, ніж, наприклад, гексадекан, що робить технології з їх використанням привабливішими з економічної точки зору.

На наступному етапі аналізували емульгувальні властивості нативної культуральної рідини, а також культуральної рідини, розбавленої у 10 і 50 разів (табл. 2). Як видно з наведених у табл. 2 даних, незалежно від ступеню розбавлення індекс емульгування культуральної рідини після вирощування штаму *N. vaccinii* K-8 на глюкозі становив 100 %. Цікаво зазначити, що за умови розведення у 50 разів культуральної рідини, одержаної після культивування штаму на етанолі,

її емульгувальні властивості підвищувалися (50–60 і 75–80 % для нативної і розбавленої культуральної рідини відповідно). Ці дані можуть свідчити про те, що під час росту *N. vaccinii* К-8 на гідрофільних субстратах синтезується комплекс сполук, і у процесі розбавлення відбувається вивільнення речовин чи груп, відповідальних за емульгувальні властивості.

Таблиця 2

**Емульгувальні властивості метаболітів, синтезованих
Nocardia vaccinii К-8**

Джерело вуглецю та енергії	Середовище	Індекс емульгування (E ₂₄ , %) культуральної рідини		
		Без розведення	1: 9	1: 49
Глюкоза	1	100±5,0	100±5,0	100±5,0
	2	100±5,0	100±5,0	100±5,0
Етанол	1	50±2,5	60±3,0	80±4,0
	2	60±3,0	60±3,0	75±3,7

Примітки. Концентрація етанолу – 2 % (об'ємна частка), глюкози – 2% (масова частка). Тривалість культивування – 120 год. Субстрат для емульгування – соняшникова олія. Посівний матеріал вирощений на МПА.

У подальших експериментах штам *N. vaccinii* К-8 вирощували на середовищах 2 і 3. Це було зумовлено тим, що показники синтезу ПАР на всіх досліджуваних середовищах практично не відрізнялись (див. табл. 1 і 2), проте середовища 2 і 3 є значно дешевшими порівняно з середовищем 1, оскільки вміст солей у їх складі майже у три рази нижчий, ніж у середовищі 1.

Дослідження способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР штамом *N. vaccinii* К-8 показало, що за використання інокуляту, вирощеного на рідких мінеральних середовищах, спостерігали зниження показника умовної концентрації ПАР (табл. 3). Так, значення ПАР* при застосуванні посівного матеріалу з МПА і ГКА становило 1,0–1,2, а за використання інокуляту з рідкого середовища – не перевищувало 0,7. Ці

**Залежність синтезу ПАР *Nocardia vaccinii* К-8
від способу вирощування посівного матеріалу**

Середовище для вирощування інокуляту	Середовище культивування	Показники	
		ПАР*	E ₂₄ , %
МПА	2	1,0±0,05	75±3,7
	3	1,0±0,05	100±5,0
ГКА	2	1,2±0,06	75±3,7
	3	1,0±0,05	100±5,0
Середовище 2 з етанолом (0,5 %)	2	0,7±0,03	Н.в.
Середовище 3 з етанолом (0,5 %)	3	0,8±0,04	Н.в.

Примітки. Тривалість культивування – 120 год. Індекс емульгування для культуральної рідини, розбавленої в 50 разів. Джерело вуглецю у середовищі культивування – етанол (2 %).

дані можуть свідчити або про ауксотрофність штаму *N. vaccinii* К-8, або про його потребу у мікроелементах. Слід зазначити, що при вирощуванні посівного матеріалу на агаризованих середовищах клітини продуцента можуть містити необхідні фактори росту ендогенної природи, достатні для одного циклу культивування на рідкому середовищі, проте при подальших послідовних пересівах ростові фактори повинні вноситись у рідкі середовища екзогенно.

У табл. 4 наведено дані про синтез ПАР штамом *N. vaccinii* К-8 залежно від концентрації джерел вуглецю у середовищі культивування. У попередніх експериментах бактерії вирощували на середовищах з 2 % етанолу чи глюкози. Проте рівень синтезу ПАР при цьому був невисоким, а отже, ростові субстрати використовувались неефективно. У зв'язку з цим ми припустили, що концентрація джерела вуглецю у середовищі культивування *N. vaccinii* К-8 може бути знижена. Дійсно, експерименти показали, що зниження концентрації етанолу і глюкози до 1 % у середовищі 3 супроводжувалось підвищенням синтезу ПАР (табл. 4).

**Залежність синтезу ПАР від концентрації джерела вуглецю
у середовищі культивування *Nocardia vaccinii* К-8**

Середовище культивування	Джерело вуглецю	Концентрація джерела вуглецю, %	Показники	
			ПАР*	E ₂₄ , %
2	етанол	1,0	1,1±0,05	70±3,5
		2,0	1,2±0,06	75±3,7
3	етанол	1,0	1,3±0,06	100±5,0
		2,0	1,1±0,05	100±5,0
	глюкоза	1,0	2,5±0,12	100±5,0
		2,0	2,1±0,10	100±5,0

Примітки. Посівний матеріал вирощений на ГКА. Тривалість культивування – 168 год.

Під час культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі 2 з етанолом незалежно від концентрації субстрату показники синтезу ПАР були практично однаковими. Слід зазначити, що у процесі дослідження впливу концентрації джерела вуглецю на синтез ПАР тривалість культивування продуцента становила 168 год, а під час проведення попередніх досліджень, результати яких наведено у табл. 1–3, штам вирощували упродовж 120 год. Тому у наступних експериментах досліджували залежність синтезу ПАР від тривалості культивування *N. vaccinii* К-8 (табл. 5).

Як свідчать дані, наведені у табл. 5, максимальне значення умовної концентрації ПАР (1,2–1,3) спостерігається на 120 год культивування бактерій на середовищі 2 і на 168 год вирощування на середовищі 3.

З літератури відомо, що наявність у середовищі культивування мікроелементів і факторів росту є сприятливою умовою для синтезу ПАР багатьма мікроорганізмами [3, 5, 7]. Наші експерименти показали, що за одночасної наявності у середовищі з етанолом дріжджового автолізу і

іонів заліза показники синтезу ПАР підвищувалися майже у три рази (табл. 6).

Таблиця 5

**Вплив тривалості культивування *Nocardia vaccinii* К-8
на синтез поверхнево-активних речовин**

Середовище культивування	Тривалість, год	ПАР*	Біомаса, г/л
2	72	0	0,07±0,01
	120	1,2±0,06	2,15±0,10
	168	1,1±0,05	3,1±0,15
3	72	0	0,14±0,01
	120	0,7±0,03	0,75±0,03
	168	1,3±0,06	2,95±0,14

Примітки. Джерело вуглецю – етанол (1%). Посівний матеріал вирощений на ГКА.

Таблиця 6

**Вплив мікроелементів і дріжджового автолізату
на синтез ПАР *Nocardia vaccinii* К-8**

Наявність у середовищі		ПАР*	Емульгувальна активність (E ₂₄ , %) розбавленої у 50 раз культуральної рідини
Іонів заліза	Дріжджового автолізату		
–	–	0,7±0,03	60±3,0
+	–	0,9±0,04	95±4,5
–	+	1,3±0,06	85±4,2
+	+	2,0±0,10	96±4,7

Примітки. Культивування здійснювали на середовищі 2, концентрація етанолу – 1 %, інокулянт вирощували до середини експоненційної фази росту на середовищі 2 з етанолом (0,5 %). Кількість інокуляту - 5 %, тривалість культивування – 120 год.

Висновки. Встановлена здатність *Nocardia vaccinii* К-8 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями у процесі росту на гідрофільних (етанол, глюкоза) і гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) субстратах. Рівень синтезу цих сполук

залежав від складу поживного середовища (у тому числі від природи і концентрації джерела вуглецю, наявності факторів росту), тривалості культивування і способу підготовки посівного матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология . – 2005. – № 6. – С. 27–36

2. 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. – Т. 41, № 1. – С. 58–63.

3. Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61, N 1. – P. 47–64.

4. 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.

5. Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 // Microbiol. Res. – 2001. – V. 155, N 4. – P. 249–256.

6. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 154–162.

7. Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Pereria N.Jr., Alves T.L., Menezes E.P., Freire D.M. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2001. – V. 91-93. – P. 459–467.

Одержана редколегією 18 квітня 2008 р.