

Пирог Т.П., д-р біол. наук  
Манжула Н.А. , магістрант  
T. Pirog, N. Manzhula

**СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ПРОЦЕСІ  
КУЛЬТИВУВАННЯ *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛІЦЕРИНІ**

**THE SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES UNDER  
*NOCARDIA VACCINII* К-8 CULTIVATION ON GLYCEROL**

*Встановлена можливість використання як субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) штамом *Nocardia vaccinii* К-8 гліцерину – побічного продукту виробництва біодизелю з рослинних олій і тваринних жирів. Максимальні показники синтезу ПАР (умовна концентрація ПАР до 4,2) на середовищі з 0,5 % гліцерину спостерігалися за наявності у середовищі іонів заліза і дріжджового автолізу, використанні інокуляту, вирощеного на гліцерині до середини експоненційної фази росту, тривалості культивування 168 год. Одержані дані є вихідними для розробки технології синтезу ПАР штамом *Nocardia vaccinii* К-8.*

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

*The possibility of using as substrate for surface active substances (SAS) synthesis by strain *Nocardia vaccinii* К-8 of glycerol – co-product generated during biodiesel production from vegetable oils and animal fats was shown. Maximal characteristics of SAS synthesis (conditional*

*concentration of SAS to 4,2) on glycerol (0,5 %) were observed under such conditions: presence in the medium of yeast autolysate and iron ions, using of inoculum from exponential growth phase, during of cultivation 168 h. The obtained data are bases for development of technology of SAS synthesis by strain Nocardia vaccinii K-8.*

**Key words:** *surface active substances, emulsifying properties, cultivation, biosynthesis, Nocardia vaccinii, glycerol*

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні до теперішнього часу не реалізовано, а факторами, які стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [1].

У літературі зазначається, що одним з потенційних шляхів підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості) [2]. На теперішній час одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин – побічний продукт, утворюваний у великих кількостях при виробництві біодизелю з рослинної і тваринної сировини [3]. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [3]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на теперішній час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі. Одним із шляхів утилізації

гліцерину може бути використання його як джерела вуглецю і енергії при розробці технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження використання гліцерину як ростового субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин.

Основним об'єктом досліджень був штам *Nocardia vaccinii* К-8, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту [4].

Культивування бактерій здійснювали на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): **середовище 1:**  $\text{NaNO}_3$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; **середовище 2:**  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1, рН 6,8–7,0.

Як джерело вуглецю і енергії використовували гліцерин у концентрації 0,5 і 1,0 % (об'ємна частка). В одному з варіантів *N. vaccinii* К-8 культивували на середовищі 1, в яке додатково вносили (окремо і разом) дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів [5] або  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001 г/л. Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту (72 год культивування), вирощену на середовищах 1 і 2 з 0,5 % (об'ємна частка) етанолу і 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину. Кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища.

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

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 ( $\sigma_s$ ) 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  $\sigma_s$  від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР\*. Умовна концентрація ПАР виражається у безрозмірних одиницях;

3) індекс емульгування ( $E_{24}$ , %) культуральної рідини, розбавленої у 50 раз дистильованою водою, який визначали за методом, описаним у праці [5]. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

На першому етапі визначали тривалість вирощування *Nocardia vaccinii* К-8 на середовищі з гліцерином, за якого показники синтезу ПАР є максимальними (табл. 1). Як видно з даних, наведених у табл. 1, у процесі росту бактерій на обох середовищах характер зміни біомаси, умовної концентрації ПАР і індексу емульгування є практично однаковими. Так, концентрація біомаси і показник ПАР\* досягали максимальних значень (0,7-0,8 г/л і 1,5-1,8 відповідно) на 168 год культивування. У той же час індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини був найвищим (100 %) на 120 год росту, а до кінця культивування знижувався до 60-85 % (табл. 1). Ці дані можуть свідчити про те, що у процесі вирощування *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині синтез метаболітів з емульгувальними властивостями передують утворенню поверхнево-активних речовин. Встановлені закономірності можуть виявитися корисними при розробці технологій ПАР чи емульгатора *Nocardia vaccinii* К-8 залежно від конкретної області їх практичного використання.

**Залежність синтезу поверхнево-активних речовин  
від тривалості культивування *Nocardia vaccinii* К-8 на середовищах  
різного складу з гліцерином (0,5 %)**

Середовище культивування	Тривалість росту, год	Показники росту і синтезу ПАР		
		Біомаса, г/л	ПАР*	E <sub>24</sub> , %
1	72	0,30±0,02	0,3±0,02	Н.в.
	120	0,75±0,03	0,7±0,03	100
	168	0,85±0,04	1,5±0,07	85±4,2
2	72	0,25±0,01	0	Н.в.
	120	0,60±0,03	0,7±0,03	100
	168	0,70±0,03	1,8±0,08	60±3,0

*Примітки.* Індекс емульгування визначали для культуральної рідини, розбавленої у 50 разів. Посівний матеріал вирощений на ГКА. Н.в. – не визначали.

Наші подальші експерименти були спрямовані на визначення умов культивування бактерій, що забезпечують підвищення синтезу ПАР. Одним із факторів, що суттєво впливає на утворення продуктів мікробного синтезу, є спосіб підготовки посівного матеріалу. Цей етап досліджень є необхідним у процесі розробки будь-якої біотехнології, оскільки культивування продуцента в ферментаторі передбачає стадії одержання посівного матеріалу на рідких середовищах. Дані, наведені у табл. 2, свідчать про те, що використання інокуляту, вирощеного на рідких поживних середовищах з етанолом і гліцерином, супроводжується зниженням показників синтезу ПАР. У разі застосування посівного матеріалу з рідких середовищ суттєво ( майже у три рази) знижується також і рівень біомаси. Встановлені закономірності можуть свідчити про потребу *Nocardia vaccinii* К-8 у факторах росту або мікроелементах.

Аналогічні результати були одержані нами при дослідженні синтезу ПАР у процесі росту *Nocardia vaccinii* K-8 на етанолі.

Таблиця 2

**Вплив способу приготування посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин під час культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на середовищах різного складу з гліцерином (0,5 %)**

Середовище культивування	Середовище для одержання інокуляту	Джерело вуглецю при одержанні інокуляту	Показники процесу	
			ПАР*	Біомаса, г/л
1	ГКА	–	1,5±0,07	0,85±0,04
	1	Гліцерин, 0,5 %	1,2±0,06	0,25±0,01
	2	Етанол, 0,5 %	1,3±0,06	0,30±0,02
2	ГКА	–	1,8±0,09	0,70±0,03
	2	Гліцерин, 0,5 %	0,9±0,04	0,25±0,01
	2	Етанол, 0,5 %	1,1±0,05	0,25±0,01

*Примітки.* Тривалість культивування 168 год.

Ми вважаємо, що вищі показники синтезу ПАР з використанням інокуляту з агаризованих середовищ зумовлене наявністю у клітинах ендогенних ростових факторів завдяки вирощуванню на багатому середовищі (у даному разі – на ГКА).

Показники синтезу ПАР у процесі культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на середовищах з різними концентраціями гліцерину наведено у табл. 3. Одержані дані показують, що збільшення концентрації гліцерину удвічі (до 1 %) супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР,

**Залежність синтезу поверхнево-активних речовин від концентрації гліцерину у середовищі культивування *Nocardia vaccinii* K-8**

Середовище культивування	Концентрація гліцерину, %	Показники процесу	
		ПАР*	Біомаса, г/л
1	0,5	1,2±0,06	0,25±0,01
	1,0	2,5±0,12	0,35±0,02
2	0,5	0,9±0,04	0,25±0,01
	1,0	1,2±0,06	0,25±0,01

*Примітки.* Тривалість культивування 168 год. Посівний матеріал вирощений на відповідних мінеральних середовищах з 0,5 % гліцерину.

причому на середовищі 1 цей показник підвищився у два рази (з 1,2 до 2,5), а на середовищі 2 – лише у 1,3 рази (з 0,9 до 1,2). Слід зазначити, що концентрація біомаси залишалася на рівні 0,25-0,35 г/л незалежно від концентрації гліцерину у середовищі культивування. Такі результати є ще одним доказом на користь того, що *Nocardia vaccinii* K-8 є ауксотрофом або потребує мікроелементів.

Попередніми дослідженнями було встановлено, що за одночасної наявності у середовищі з етанолом дріжджового автолізу та іонів заліза показники синтезу ПАР *Nocardia vaccinii* K-8 підвищувалися майже у три рази. Подальші експерименти показали, що внесення у середовище 1 з гліцерином сульфату заліза, мікроелементів і дріжджового автолізу (окремо чи в різних можливих комбінаціях) супроводжувалось підвищенням або синтезу ПАР, або біомаси, або цих обох досліджуваних показників (табл. 4).

Так, наприклад, за наявності іонів заліза рівень біомаси підвищувався у 5–9 разів (до 1,2–2,2 г/л), а за присутності дріжджового

**Вплив мікроелементів і дріжджового автолізу на синтез ПАР  
*Nocardia vaccinii* K-8 у процесі росту на гліцерині**

Наявність у середовищі			ПАР*	Біомаса, г/л
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	мікроелементів	дріжджового автолізу		
–	–	–	1,2±0,06	0,25±0,01
–	–	+	3,0±0,15	1,1±0,05
–	+	–	2,9±0,14	0,5±0,02
+	–	–	0,9±0,04	1,2±0,06
–	+	+	1,7±0,08	0,85±0,04
+	–	+	4,2±0,20	2,0±0,10
+	+	–	2,6±0,13	1,7±0,08
+	+	+	4,2±0,20	2,2±0,11

*Примітки.* Культивування здійснювали на середовищі 1 упродовж 168 год. Концентрація гліцерину у середовищі 0,5 %. Посівний матеріал вирощений на середовищі 1 з 0,5 % гліцерину.

автолізу – у 3,5–9 разів. У той же час не помічено позитивного впливу заліза на синтез ПАР: за внесення у середовище сульфату заліза показник умовної концентрації ПАР знижувався з 1,2 до 0,9 (на фоні підвищення біомаси). Наявність мікроелементів у середовищі культивування стимулювала утворення ПАР, але не біомаси: умовна концентрація ПАР збільшувалася до 2,9, тобто майже у 2,5 раза, а концентрація біомаси підвищувалася з 0,25 до 0,5 г/л.

Найвищі показники умовної концентрації ПАР (4,2) і найбільший рівень біомаси (2,0–2,2 г/л) спостерігалися за одночасної наявності у середовищі культивування іонів заліза і дріжджового автолізу, а також іонів заліза, мікроелементів і дріжджового автолізу. Цікаво зазначити, що за внесення у середовище тільки мікроелементів і



дріжджового автолізату показник ПАР\* і концентрація біомаси збільшувались незначно (до 1,7 і 0,85 г/л відповідно). Можна припустити, що необхідний для синтезу ПАР мікроелемент міститься також і у дріжджовому автолізаті, і сумарна концентрація цього мікроелементу, що досягається у середовищі за одночасного внесення як дріжджового автолізату, так і розчину мікроелементів стає вищою за оптимальну, що й призводить до зниження синтезу ПАР.

**Висновки.** У результаті проведеної роботи встановлена здатність штаму *Nocardia vaccinii* K-8 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями у процесі росту на гліцерині. Рівень синтезу цих сполук залежав від складу поживного середовища (зокрема, концентрації гліцерину і наявності факторів росту), тривалості культивування і способу підготовки посівного матеріалу.

### Список літератури

1. *Mukherjee S., Das P., Sen R.* Towards commercial production of microbial surfactants // Trends in Biotechnology. –2006. – Vol.24, No.11 – P. 354–359.
2. *Makkar R.S., Cameotra S.S.* An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58. – P. 428–434.
3. *Yazdani S.S., Gonzales R.* Anaerobic fermentation og glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – Vol. 18. – P. 213–219.
4. *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.

5. 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.

*Надійшла до редколегії 5 лютого 2008 р.*