

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 (відході 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 1C» (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 ІР-1М2 (Росія) при температурі 55 °С та абсолютному тиску 0,4 атм. Для одержання супернатанту КР центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв.

Усі досліди проводили в 3-х повторах, 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. vassinii* 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%) спостережали 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 підлучення 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 С₄-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 C₄-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. Лакин 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-активных 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 ПОВЕРХНОСТНО-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.

