

18. Jitrapakdee S., Wallace J.C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase // Biochem. J. – 1999. – **340**, N 1. – P.1–16.
19. Mobely H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P. Molecular biology of microbial urease // Microbiol. Rev. – 1995. – **59**, N 3. – P. 451–479.
20. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 1. – P. 154–162.
21. Scrutton M.C., Utter M.F. Pyruvate carboxylase. III. Some physical and chemical properties of the highly purified enzyme // J. Biol. Chem. – 1965. – **240**, N 1. – P. 1–9.
22. Wendish V.F., de Graaf A.A., Sahn H., Eikmanns B.J. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose // J. Bacteriol. – 2000. – **182**, N 11. – P. 3088–3096.

Отримано 11.10.2010

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог^{1,2}, Н.А. Гриценко¹, Д.И. Хомяк¹, А.Д. Конон¹, С.И. Антонюк¹

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

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

ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* К-8 ПРИ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ

Селекционирован штамм бактерий Nocardia vaccinii К-8 – продуцент поверхностно-активных веществ (ПАВ) на глицерине (побочный продукт производства биодизеля из растительных масел и животных жиров).

С помощью однофакторных экспериментов и математических методов планирования оптимизирован состав питательной среды, обеспечивающий максимальные показатели синтеза ПАВ N. vaccinii К-8 (0,5 г/л NaNO₃, 0,3 г/л дрожжевого экстракта и 1,5 % глицерина).

По химическому составу ПАВ, синтезированные N. vaccinii К-8 на глицерине, являются комплексом нейтральных, глико- и аминоклипоидов. Нейтральные липиды представлены миколовыми и n-алкановыми кислотами, гликолипиды – трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами. Одновременное внесение в среду с глицерином 0,2 % фумарата (предшественник глюконеогенеза) и 0,2 % цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста штамма К-8 сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 40 % по сравнению с культивированием бактерий на среде без органических кислот.

Ключевые слова: бактерии рода Nocardia, поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, отходы производства биодизеля.

Глицерин – простой спирт (1,2,3-пропантриол), является одним из основных продуктов трансэтерификации растительных масел и животных жиров [6, 17]. На сегодняшний день этот спирт в огромных количествах образуется при производстве биодизеля в качестве побочного продукта технологии, и с каждым годом его накапливается все больше и больше [4, 6, 17]. Отметим, что на каждые 100 л биодизеля образуется приблизительно столько же технического глицерина. Только за период с 2004 по 2006 год цена на глицерин снизилась более чем в 10 раз. Известные потребители глицерина – парфюмерно-косметическая промышленность, военно-промышленный комплекс – не способны обеспечить достаточный уровень его утилизации [17]. Поэтому необходим поиск альтернативных путей решения этой проблемы.

Некоторые стратегии базируются на химической и биологической переработке глицерина. Биологическая модификация позволяет обойти недостатки химического катализа (низкая специфичность, использование высокого давления и температуры), производя при этом огромное количество разнообразных практически ценных продуктов, в том числе и микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В последние годы микробные ПАВ являются объектом интенсивных теоретических и прикладных исследований, что обусловлено их возможным практическим использованием в

© Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко, Д.И. Хомяк, А.Д. Конон, С.И. Антонюк, 2011

различных отраслях промышленности, а также для очистки окружающей среды. Преимуществами микробных ПАВ по сравнению с химическими аналогами является биodeградельность, нетоксичность, постоянство физико-химических свойств в широком диапазоне pH и температуры [3].

В предыдущих исследованиях из загрязненных нефтью образцов почвы выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium* sp.К-2 [1]. Установлена возможность очистки воды, загрязненной нефтью (100 мг/л), иммобилизованными на керамзите клетками *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaccinii* К-8. Известно, что способность к ассимиляции углеводородных субстратов у микроорганизмов часто обусловлена синтезом ПАВ [3].

Цель данной работы – исследовать возможность образования поверхностно-активных веществ *N. vaccinii* К-8 на глицерине и установить условия культивирования бактерий на этом субстрате, обеспечивающие повышение синтеза ПАВ.

Материалы и методы. Культивирование *N. vaccinii* К-8 осуществляли на базовой жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): $\text{NaNO}_3 - 1,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,001$; pH 6,8–7,0. Эта среда предложена корейскими авторами для культивирования бактерий рода *Nocardia* [9].

При изучении влияния природы источника азота на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 нитрат натрия был заменен на эквимоллярные по азоту концентрации KNO_3 , или NH_4NO_3 или $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$.

При оптимизации состава питательной среды с помощью методов математического планирования эксперимента использовали варианты среды, в которых концентрация NaNO_3 составляла 0,5 и 1,5 г/л. В качестве источника углерода и энергии использовали глицерин в концентрации 0,5–3,5 % (по объему). В среду дополнительно вносили дрожжевой экстракт в концентрации 0,15–0,5 г/л.

Исследования по оптимизации состава питательной среды осуществляли по схеме полного факторного эксперимента (ПФЭ) 2^3 , включающего план по каждому фактору (компонент среды – нитрат натрия, глицерин, дрожжевой автолизат), представленному в минимальных и максимальных его концентрациях. Полученные результаты анализировали согласно алгоритму Иетса с использованием формул, рекомендованных в практикуме [2].

В одном из вариантов в среду с глицерином в начале стационарной фазы роста вносили цитрат и фумарат натрия (0,1–0,5 %). Соли органических кислот вносили в среду в виде 10 %-ных растворов.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродного питания, и при добавлении их в среду меняется не только концентрация углерода, но и соотношение C/N, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания основного источника углеродного питания (глицерин). Цель коррекции – ввести эквимоллярное количество углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в среде культивирования продуцента.

В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на глюкозо-картофельном агаре (ГКА), а также культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную на среде указанного выше состава с 0,5 % глицерина. Количество инокулята – 10 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл). В одном из экспериментов количество инокулята составляло 5 и 15 %.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °C в течение 96–168 ч.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования ($E_{2,4}$, %) культуральной жидкости, а также количество синтезированных ПАВ (г/л) и выход ПАВ (% от субстрата), которые определяли, как описано нами ранее [12].

Качественный анализ поверхностно-активных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 («Merck», Германия) в 4 системах растворителей: полярная система I – хлороформ–метанол–вода (85:15:1); полярная система II – хлороформ–метанол–вода (65:15:2); неполярная система III – гексан–ди-

этиловый эфир (2:1); неполярная система IV – гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (90:10:1) [12]. Для идентификации липидных фракций использовали специфические реагенты: пластинки окрашивали спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и парами йода (нейтральные липиды), раствором нингидрина (аминолипиды), анисовым альдегидом и антроновым реактивом (гликолипиды) Липиды экстрагировали из культуральной жидкости и супернатанта смесью хлороформ–метанол, как описано ранее [12]. Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [12]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе изучали влияние некоторых условий культивирования на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8. Исследование зависимости образования поверхностно-активных веществ от природы источника азотного питания показало, что оптимальным источником азота для *N. vaccinii* К-8 является нитрат натрия (табл. 1). Отметим, что и литературные данные свидетельствуют о том, что наиболее благоприятным источником азота для синтеза ПАВ бактериями рода *Nocardia* (правда, на гексадекане) также является нитрат натрия [9].

Дальнейшие эксперименты были посвящены установлению оптимального способа подготовки посевного материала, обеспечивающего максимальные показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8. Вначале исследовали влияние дрожжевого экстракта и сульфата железа в среде для получения инокулята на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8. Мы предполагали, что наличие в клетках бактерий эндогенных запасов после выращивания на агаризованной среде (первый этап получения посевного материала) позволит исключить эти компоненты из состава жидкой среды для получения инокулята на втором этапе. В биотехнологических процессах в качестве посевного материала обычно используют культуру из экспоненциальной фазы роста. Отметим, что длительность получения такого инокулята приблизительно в два раза меньше, чем продолжительность производственного биосинтеза. В связи с этим предположили, что концентрацию источника азота в среде для получения посевного материала можно снизить.

Таблица 1

Влияние природы источника азота на накопление биомассы и ПАВ *N. vaccinii* К-8

Источник азота	Показатели процесса	
	ПАВ*	Биомасса, г/л
NaNO ₃	4,2±0,12	1,2±0,06
KNO ₃	2,6±0,09	1,0±0,05
NH ₄ NO ₃	1,2±0,7	0,3±0,01
(NH ₂) ₂ CO	1,7±0,8	0,3±0,01

Примечания. Получение инокулята и культивирование осуществляли на базовой среде, содержащей 0,5 % глицерина, 0,25 г/л дрожжевого экстракта и 0,001 г/л FeSO₄·7H₂O. Посевной материал (10 %) выращен до середины экспоненциальной фазы роста. Длительность культивирования 168 ч.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, наше предположение о возможности снижения содержания нитрата натрия в среде для получения посевного материала подтвердилось. Кроме того, эксперименты показали, что наличие в такой среде дрожжевого экстракта и сульфата железа положительно влияет на синтез ПАВ.

Поскольку синтез ПАВ зависит не только от физиологического состояния (фазы роста) инокулята, но и от его концентрации, на следующем этапе определяли оптимальную для образования ПАВ *N. vaccinii* К-8 концентрацию посевного материала. В этих экспериментах использовали инокулят из середины экспоненциальной фазы роста (табл. 3).

Полученные результаты показали, что максимальное значение условной концентрации ПАВ наблюдалось при использовании 10 % посевного материала.

Представленные в табл. 2 данные показывают зависимость синтеза ПАВ от содержания таких компонентов среды как источник азота (NaNO₃) и дрожжевой экстракт. Еще одним важным компонентом, концентрация которого влияет на синтез ПАВ, является источник углерода

и энергии (глицерин). Именно по этим трем факторам на следующем этапе исследований оптимизировали состав питательной среды для *N. vaccinii* К-8, используя для этого математические методы планирования эксперимента.

Таблица 2

Влияние концентрации источника азота, дрожжевого экстракта и сульфата железа в среде на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8

№	Концентрация NaNO ₃ , г/л	Дрожжевой экстракт, г/л	FeSO ₄ ·7H ₂ O, г/л	ПАВ*
1	0,5	0,25	0,001	1,9±0,07
2	1	0,25	0,001	1,5±0,05
3	0,5	0	0	1,1±0,03
4	1	0	0	1,0±0,03
5	0,5	0,25	0	1,7±0,06
6	1	0,25	0	1,5±0,05

Примечания. Культивирование осуществляли в течение 96 ч. Концентрация глицерина в среде 0,5 %. В качестве посевного материала использовали культуру, выращенную на ГКА.

Таблица 3

Синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 в зависимости от концентрации инокулята

Концентрация инокулята, %	ПАВ*	Биомасса, г/л
5	2,7±0,10	0,8±0,06
10	4,2±0,13	1,3±0,08
15	2,6±0,12	1±0,07

Примечания. Длительность культивирования 168 ч. Среда для получения инокулята и биосинтеза ПАВ содержала 0,5 % глицерина, 0,25 г/л дрожжевого экстракта и 0,001 г/л FeSO₄·7H₂O.

При постановке первого комплекса экспериментов важно правильно подобрать концентрации компонентов среды в диапазоне от значений, лимитирующих синтез целевого продукта, к значениям, его ингибирующим (табл. 4). Результаты исследований представлены с помощью матрицы композиционного плана полного факторного эксперимента 2³ (табл. 4). Матрица показывает все возможные комбинации трех факторов на двух уровнях (нижнем и верхнем).

Как видно из представленных в табл. 5 данных, максимальное значение ПАВ* наблюдалось в варианте № 6, в котором концентрации глицерина и дрожжевого экстракта были на верхнем, а концентрация нитрата натрия – на нижнем уровне. Отметим, что наиболее высокая условная концентрация ПАВ зафиксирована во всех вариантах, в которых концентрация источника азота была минимальной.

Математическая обработка полученных данных показала значимость всех исследуемых компонентов среды, а уравнение регрессии (1) позволило сделать выводы об уровне их оптимальных концентраций:

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

Коэффициенты в уравнении (1) в определенной степени характеризуют процесс биосинтеза. Так, если коэффициент со знаком «-», то повышение концентрации соответствующего фактора приведет к снижению количества синтезированного целевого продукта, а в случае знака «+» увеличение концентрации этого фактора будет сопровождаться повышением количества ПАВ. Основываясь на результатах первой серии экспериментов, мы установили новые концентрации факторов (табл. 6). Данные, представленные в табл. 6, свидетельствуют, что на следующем этапе исследований концентрацию источника азота необходимо оставить на прежнем уровне, а концентрацию двух других факторов увеличить. Результаты второй серии экспериментов представлены в табл. 7.

Таблица 4

**Концентрации компонентов питательной среды для синтеза
ПАВ *N. vaccinii* К-8 (первый этап) в плане ПФЭ 2³**

№	Исследуемый фактор	Уровни исследуемых факторов		
		-1	0	+1
1	Глицерин (%), x_1	0,5	1	1,5
2	NaNO_3 (г/л), x_2	0,5	1	1,5
3	Дрожжевой экстракт (г/л), x_3	0,15	0,2	0,25

Таблица 5

**Результаты реализации экспериментов по плану ПФЭ 2³
(первый этап)**

№	Уровни факторов			ПАВ*
	Глицерин	NaNO_3	Дрожжевой экстракт	
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

Таблица 6

**Концентрации компонентов среды для синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 (второй этап)
в плане ПФЭ 2³**

№	Исследуемый	Уровни исследуемых факторов		
		-1	0	+1
1	Глицерин (%), x_1	1,5	2,5	3,5
2	NaNO_3 (г/л), x_2	0,5	1	1,5
3	Дрожжевой экстракт (г/л), x_3	0,3	0,4	0,5

Таблица 7

**Результаты реализации экспериментов по плану ПФЭ 2³
(второй этап)**

№	Уровни факторов			
	Глицерин	NaNO_3	Дрожжевой экстракт	ПАВ*
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

Как видно из представленных в табл. 7 данных, максимальный результат (условная концентрация ПАВ 5,2) наблюдалась в варианте № 1, в котором концентрации всех факторов

были на нижнем уровне. Анализ уравнения регрессии (2) показал, что наибольшее влияние на процесс оказывают концентрации глицерина и нитрата натрия:

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

Значения коэффициентов в уравнении (2) свидетельствуют о том, что более высокие показатели синтеза ПАВ будут наблюдаться при минимальных концентрациях глицерина и нитрата натрия. Отметим, что это уравнение не описывает зависимости синтеза ПАВ от концентрации дрожжевого экстракта, однако поскольку максимальный результат достигался в варианте, в котором концентрация экстракта составляла 0,3 (минимальный уровень, см. табл. 7) можно сделать соответствующий вывод о его содержании в среде культивирования *N. vaccinii* К-8.

Таким образом, использование математических методов планирования эксперимента позволило повысить условную концентрацию ПАВ на 23 % по сравнению с результатами однофакторных исследований.

На следующем этапе количество ПАВ, синтезированных при культивировании штамма К-8 на оптимизированной среде, анализировали весовым методом. Это было обусловлено тем, что не всегда использование в качестве критерия синтеза ПАВ показателя условной концентрации дает корректные результаты. Вместе с тем у показателя ПАВ* есть одно существенное преимущество: это экспресс-метод, который позволяет достаточно быстро (в течение 10–20 мин) оценить уровень синтеза ПАВ. В данных экспериментах также еще раз уточняли оптимальную для синтеза ПАВ концентрацию глицерина. Данные, представленные в табл. 8, свидетельствуют о том, что после оптимизации состава среды с использованием математических методов удалось повысить синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 в 4 раза.

На следующем этапе анализировали химический состав ПАВ, синтезированных в оптимальных условиях культивирования штамма К-8 на глицерине. Низкомолекулярные микробные ПАВ по своей химической природе являются, как правило, комплексом липидов (нейтральных, глико-, amino-, фосфолипидов) как внеклеточных, так и ассоциированных с клетками [3]. Изучение качественного состава липидов, экстрагированных из культуральной жидкости после выращивания *N. vaccinii* К-8 на среде 2 с глицерином и супернатанта, показало, что основными компонентами органического экстракта являются глико-, amino- и нейтральные липиды. Нейтральные липиды представлены в основном миколовыми и *n*-алкановыми кислотами, а гликолипиды – трегалозодиацилатами и трегалозо-6,6'-димиколатами. Отметим, что по качественному составу липиды, выделенные из культуральной жидкости и супернатанта, практически не отличались между собой.

Таблица 8

Влияние концентрации глицерина на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8

Концентрация глицерина, %	Концентрация ПАВ, г/л	Выход ПАВ от заданного субстрата, %
1,5	9,6±0,21	51±2,5
	12,6±0,24	67±3,3
2,0	7,8±0,19	31±1,5
	12,2±0,22	49±2,4
2,5	7,6±0,18	24±1,2
	12,3±0,23	39±2,0

Примечания. При культивировании *N. vaccinii* К-8 на неоптимизированной среде количество синтезированных ПАВ составляло 3 г/л.

Исходя из химической природы ПАВ, мы предположили, что можно повысить эффективность процесса их биосинтеза путем внесения в среду цитрата натрия – регулятора синтеза липидов и C₄-дикарбоновых кислот (фумарата) – предшественников глюконеогенеза, функционирующего при выращивании бактерий на неуглеводных субстратах. Ранее такой подход был использован нами для повышения синтеза ПАВ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 [19]. Эксперименты показали, что внесение как цитрата, так и фумарата в среду с глицерином сопровождалось повышением синтеза ПАВ (табл. 9). Однако максимальные показатели – повышение на 35–40 % условной концентрации ПАВ и на 20 % индекса эмульгирования по

сравнению с культивированием штамма К-8 на среде без органических кислот были достигнуты при одновременном добавлении fumarата и цитрата.

Перспективным подходом к утилизации глицерина является его использование в биотехнологической отрасли в качестве субстрата для культивирования микроорганизмов. При этом можно получать достаточно широкий спектр продуктов в зависимости от конкретного продуцента и условий проведения процесса. Преимуществами глицерина по сравнению с традиционными углеводными субстратами (глюкоза, сахароза, крахмал и др.) является низкая стоимость, доступность в больших количествах, а также более высокая степень биоконверсии. Это позволяет получать из него простые соединения (сукцинат, этанол, пропионат, водород и др.) с большим выходом, чем при использовании углеводов. Кроме этого, применение глицерина в биотехнологической промышленности может обеспечить утилизацию отходов производства биодизеля, что, в свою очередь, снизит нагрузку на экосистемы планеты.

Таблица 9

Синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 на глицерине в присутствии органических кислот

Органические кислоты, %	ПАВ*, % от контроля	E ₂₄ , % от контроля
Цитрат, 0,1	110	115
Цитрат, 0,3	120	115
Цитрат, 0,5	125	116
Фумарат, 0,1	105	102
Фумарат, 0,3	110	105
Фумарат, 0,5	120	106
Цитрат, 0,1 + Фумарат, 0,1	135	120
Цитрат, 0,2 + Фумарат, 0,2	140	120

Примечания. Контроль – показатели синтеза ПАВ на базовой среде с 1,5 % глицерина. Органические кислоты вносили в начале стационарной фазы роста.

Для микробного синтеза целевых продуктов из глицерина нет необходимости в использовании чистого спирта. Таким образом, можно использовать отходы производства биодизеля без их предварительной дополнительной обработки, что позволяет существенно снизить стоимость конечного продукта [4, 6, 17].

Уже на сегодняшний день спектр веществ, получаемых микробной конверсией глицерина достаточно широкий. Это органические кислоты (пропионат, сукцинат, пируват, цитрат) [6, 15, 17, 19], спирты (этанол, 1,3-пропандиол) [6, 17, 18], кетоны (дигидроксиацетон) [6, 17], аминокислоты (фенилаланин) [8], полиэфиры (полигидроксиалканоеат) [4], пигменты (астаксантин, продигозин) [6, 17], экзополисахариды [7] и поверхностно-активные вещества [5, 6, 10, 14, 16, 17].

Отметим, что количество ПАВ, синтезируемых различными микроорганизмами на глицерине, существенно ниже, чем на традиционных гидрофобных субстратах. Так, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T образует около 3,5 г/л ПАВ из 10 % глицерина [10], *Bacillus circulans* – 2,9 г/л из 2 % субстрата [5]. Несколько выше количество синтезированных рамнолипидов: до 8 г/л на среде с 3 % глицерина для *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 [16].

Изолированный нами штамм *N. vaccinii* К-8 в различных условиях культивирования на среде с глицерином синтезирует от 2 до 12 г/л ПАВ, т.е. не уступает по синтезирующей способности описанным в литературе продуцентам и даже превышает их. Вместе с тем, в доступной нам литературе не удалось найти сведений о способности представителей рода *Nocardia* синтезировать ПАВ при культивировании на глицерине. Более того, данные о синтезе ПАВ нокардиями весьма и весьма ограничены. Известен штамм *Nocardia* sp. L-417, образующий ПАВ на гидрофобных субстратах [9]. По химической природе ПАВ штамма L-417 представляют собой смесь жирных кислот. Отметим, что в современных обзорах литературы, посвященных микробным ПАВ, встречается информация о способности бактерий рода *Nocardia* синтезировать поверхностно-активные гликолипиды, в частности, трегалозомиколаты [3].

При этом авторы пользуются информацией конца 80-х годов XX ст., когда в литературе был описан штамм *Nocardia erythropolis* – продуцент трегалозомиколатов. Однако несколько позже штамм *Nocardia erythropolis* был реклассифицирован как *Rhodococcus erythropolis*.

Наши исследования показали, что изолированный нами штамм *N. vaccinii* К-8 синтезирует комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов, причем гликолипиды представлены в основном трегалозомиколатами.

Таким образом, наши данные являются одними из первых, свидетельствующих о способности представителей рода *Nocardia* синтезировать необычные по химическому составу ПАВ на глицеринсодержащей среде. Отметим, что установленная с помощью математических методов планирования эксперимента концентрация глицерина для синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 составляет 1,5 %, что ниже, чем известная из литературы (от 2 до 10 %). Учитывая что *N. vaccinii* К-8 образует больше ПАВ, чем другие известные продуценты [5, 10, 14, 16], то и выход целевого продукта от субстрата у селекционированного нами штамма К-8 существенно выше.

Приведенные в работе данные показывают эффективность математических методов планирования эксперимента для оптимизации состава питательной среды. Так, максимальный показатель условной концентрации ПАВ*, полученный в однофакторных исследованиях (4,2), ниже по сравнению с результатами экспериментов, в которых применялись математические методы планирования. В частности, на первом этапе, когда концентрации факторов были выбраны на основе теоретических рассуждений и результатов однофакторных экспериментов, удалось повысить показатель ПАВ* до 4,8, а уже на втором, когда диапазон концентраций факторов установлен с помощью уравнения регрессии, условная концентрация ПАВ составляла 5,2. В работе [11] авторам с помощью математических методов оптимизации состава питательной среды удалось в 3,5 раза повысить количество синтезированных *Rhodococcus erythropolis* МТСС 2794 поверхностно-активных веществ.

Сравнительная оценка данных о влиянии fumarата и цитрата на синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 (табл. 9) и наших предыдущих исследований, проведенных с *R. erythropolis* ЭК-1 [13] показала, что эффективность от использования органических кислот была выше для штамма ЭК-1. Так, при внесении fumarата (0,2 %) и цитрата (0,1 %) в среду с гексадеканом показатели синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 повышались на 55–65 %. Отметим, что на данном этапе для штамма К-8 (в отличие от штамма ЭК-1) не проводили исследований по установлению оптимальных концентраций органических кислот, обеспечивающих максимальный синтез ПАВ. Тем не менее, представленные в данной работе результаты о повышении синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 в присутствии fumarата и цитрата свидетельствуют о том, что существуют потенциальные резервы для интенсификации процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ у данных бактерий.

Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность использования для синтеза поверхностно-активных веществ глицерина – побочного продукта производства биодизеля и установлены оптимальные для синтеза ПАВ условия культивирования *N. vaccinii* К-8 на этом субстрате.

Т.П. Пироз^{1,2}, Н.А. Гриценко¹, Д.І. Хом'як¹, А.Д. Конон¹, С.І. Антонюк¹

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

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

ОПТИМІЗАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН NOCARDIA VACCINII К-8 ЗА БІОКОНВЕРСІЇ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ

Резюме

Селекціоновано штамп бактерій *Nocardia vaccinii* К-8 – продуцент поверхнево-активних речовин (ПАР) на гліцерині (побічний продукт виробництва біодизелю з рослинних олій і тваринних жирів).

За допомогою однофакторних експериментів і математичних методів планування експерименту оптимізовано склад поживного середовища, що забезпечує максимальні показники синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 (0,5 г/л NaNO₃, 0,3 г/л дріжджового екстракту і 1,5 % гліцерину).

За хімічним складом ПАР, синтезовані *N. vaccinii* K-8 на гліцерині, є комплексом нейтральних, гліко- і аміноліпідів. Нейтральні ліпіди представлені міколовими і n-алкановими кислотами, гліколіпіди – трегалозодіацелатами і трегалозоміколатами. Одночасне внесення у середовище з гліцерином 0,2 % фу-марату (попередник глюконеогенезу) і 0,2 % цитрату (регулятор синтезу ліпідів) на початку стаціонарної фази росту штаму K-8 супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР на 40 % порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот.

Ключові слова: бактерії роду *Nocardia*, поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, відходи виробництва біодизелю.

T. P.Pirog ^{1,2}, N. A. Gritsenko ¹, D.I. Khomyak ¹, A.D. Konon ¹, S.I. Antonuk ¹

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

OPTIMIZATION OF SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS OF *NOCARDIA VACCINII* K-8 UNDER BIOCONVERSION OF BIODIESEL PRODUCTION WASTE

S u m m a r y

A strain of bacteria *Nocardia vaccinii* K-8 – a producer of surfactants has been selected on glycerol (by-product of biodiesel production from oils and animal fats) .

Composition of nutrient medium providing for maximal indices of *N. vaccinii* K-8 surfactants synthesis (0.5 g/l of NaNO₃, 0.3 g/l of yeast extract and 1.5% of glycerol) has been optimized with the help of one-factor experiments and mathematical methods of design.

As to their chemical composition the surfactants of *N. vaccinii* K-8 synthesized on glycerol are a complex of neutral, glyco- and aminolipids. Neutral lipids are presented by mycolic and a-alkane acids, glycolipids – by trehalosodiaceates and trehalosomycolates. Simultaneous introduction of 0.2% of fumarate (precursor of gluconeogenesis) and 0.2% of cytrate (regulator of lipids synthesis) into the medium with glycerol at the beginning of the stationary phase of K-8 strain growth was accompanied by the 40% increase of the conditional surfactants concentration as compared with bacteria cultivation on the medium without organic acid.

The paper is presented in Russian.

К е y w o r d s: *Nocardia* genus bacteria, biosurfactants, biosynthesis intensification, biodiesel production waste.

The a u t h o r ' s a d d r e s s: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. 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. – **41**, № 1. – С. 58–63.
2. Практикум по микробиологии / Под редакцией А.И. Нетрусова. – М.: ACADEMIA, 2005. – 604 с.
3. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **87**, N 2. – P. 427–444.
4. Ciesielski S., Pokoj T., Klimiuk E. Cultivation-dependent and independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw glycerol // J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **20**, N 5. – P. 853–861.
5. Das P., Mukherjee S., Sen R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium // Biore. Technol. – 2009. – **100**, N 2. – P. 1015–1019.
6. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – **27**, N 1. – P. 30–39.
7. Freitas F., Alves V., Pais J., et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol // Biore. Technol. – 2009. – **100**, N 2. – P. 859–865.
8. Khamduang M., Packdibamrung K., Chutmanop J. et al. Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – **36**, N 10. – P. 1267–1274.
9. Kim S.H., Lim E.J., Lee S.O. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2000. – **31**, N 3. – P. 249–253.

10. Morita T., Konishi M., Fukuoka T. et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T // J. Biosci. Bioeng. – 2007. – **104**, N 1. – P. 78–81.
11. Pal M.P., Vaidya B.K., Desai K.M. et al. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – **36**, N 5. – P. 747–756.
12. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – **45**, N 3. P. 272–278.
13. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimentko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. and Microbiol. – 2010. – **46**, N 6. – P. 599–606.
14. Rooney A.P., Price N.P.J., Ray K.J., Kuo T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strain from a biodiesel facility // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – **295**, N 1. – P. 82–87.
15. Rywinska A., Rymowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **37**, N 5. – P. 431–435.
16. Silva S.N.R.L., Farias C.B.B., Rufino R.D. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – **79**, N 1. – P. 174–183.
17. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – **18**, N 3. – P. 213–219.
18. Yu K.O., Kim S.W., Han S.W. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate // J. Bacteriol. – 2010. – **150**, N 2. – P. 209–214.
19. Zhu Y., Li J., Tan M. et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source // Biores. Technol. – 2010. – **101**, N 22. – P. 8902–8906.

Отримано 16.11.2010

УДК 579.841.11.114

Р.В. Грицай, О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна*

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ КУЛЬТИВУВАННЯ НА СКЛАД ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Залежно від температури культивування *Ralstonia solanacearum* ICMP758 і ICMP749 в їхніх ліпополісахаридах (ЛПС) виявлено помітну відмінність хімічного складу. *R. solanacearum* ICMP758 раси 3, біовар 3, що походить із тропічного регіону, виявив помірні кількісні флуктуації компонентів ліпополісахариду в діапазоні досліджуваних температур. *R. solanacearum* ICMP749, що є представником адаптованої до помірного клімату раси 3, біовару 2, продемонстрував значні зміни в композиції ЛПС за температури 37 °С. Він характеризувався відсутністю рамнози, арабінози та ксилози, що є притаманними для О-специфічного полісахариду ЛПС більшості досліджених штабів *R. solanacearum*, а також втрачав 3-гідрокситетрадеканову кислоту, але появою ряду інших жирних кислот. Одночасне зростання відносного вмісту типових корових моносахаридів (глюкози, манози, глюкозаміну), дає можливість припустити утворення R-форми ЛПС під впливом підвищення температури культивування.

Ключові слова: *Ralstonia solanacearum*, температура вирощування, ліпополісахариди, склад.

Один із найбільш небезпечних патогенів рослин – *Ralstonia solanacearum* характеризується широкими адаптивними властивостями. Частково це обумовлено складною структурою представників виду, який, згідно з фенотиповою класифікацією, утворений п'ятьма расами та п'ятьма біотипами. Однак представники раси 3 біотипу 2, що походять із передгірних районів Анд і характеризуються пристосуваннями до умов субтропічного клімату, змогли поширитись територією Європи, в природних умовах, на північ аж до скандинавських країн [10]. Подолання основної перешкоди на цьому шляху – температурного фактору, пов'язане із рядом модифікацій фізіолого-біохімічних властивостей патогену, ключові з яких спрямовані на забезпечення функціонального гомеостазу клітинних мембран.

© Р.В. Грицай, О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець, 2011