

**Т.П. Пирог^{1,2}, Л.В. Никитюк¹, С.І. Антонюк¹,
Т.А. Шевчук², Г.О. Іутинська²**

¹Національний університет харчових технологій,

вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 НА ВІДПРАЦЬОВАНІЙ ОЛІЇ РІЗНОЇ ЯКОСТІ ТА ЇХ АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ

Мета. Дослідження можливих причин різного рівня антимікробної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на відпрацьованій після смаження м'яса і картоплі соняшникової олії. **Методи.** ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Критерієм антимікробної активності ПАР були мінімальні інгібуючі концентрації (МІК), які визначали методом двократних серійних розведень у м'ясопептонному бульйоні (для бактерій) і рідкому суслі (для дріжджів). **Результати.** Встановлено, що МІК щодо бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas sp.* МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3) і дріжджів (*Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6) поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії була в середньому у 2,5–8 разів нижчою, ніж відповідний показник ПАР, одержаних на відпрацьованому після смаження м'яса субстраті. Збільшення з 5 до 7 діб тривалості вироцування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії супроводжувалося синтезом ПАР, МІК яких щодо більшості досліджуваних тест-культур знижувалася у 1,4–4 рази. Показник мінімальної інгібуючої концентрації ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 корелював з наявністю у складі синтезованих ПАР аміноліпідів і активністю НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту їх біосинтезу. **Висновки.** Встановлена залежність антимікробної активності ПАР від якості пересмаженої олії та тривалості процесу засвідчує необхідність проведення досліджень впливу умов культивування продуцентів на біологічні властивості цільового продукту. Дані щодо якісного складу ПАР і активності ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів показують можливість регуляції антимікробної активності поверхнево-активних речовин зміною умов культивування продуцента.

К л ю ч о в і с л о в а: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, поверхнево-активні аміноліпіді, антимікробні властивості, відпрацьована після смаження м'яса і картоплі соняшникова олія

Раніше [1–4] було показано, що заміна рафінованої олії і очищеного гліцерину у середовищі культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на промислові відходи (відпрацьовану після смаження соняшникову олію та технічний гліцерин – відхід виробництва біодизелю) дає змогу не тільки здешевити процес біосинтезу, а й одержати цільовий продукт з високою антимікробною і антиадгезивною активністю. Причому ПАР, синтезовані на відпрацьованій після смаження картоплі олії та технічному гліцерині,

виявилися ефективнішими антимікробними агентами порівняно з одержаними на рафінованій олії та очищеному гліцерині [3, 4]. У той же час у попередніх дослідженнях [3] було встановлено залежність антимікробної активності ПАР від якості використовуваної для їх біосинтезу пересмаженої олії. Так, мінімальна інгібуюча концентрація щодо обмеженого кола тест-культур (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, деякі фітопатогенні бактерії) поверхнево-активних речовин, синтезованих на відпрацьованій після смаження картоплі олії, становила 8–52 мкг/мл і була нижчою, ніж МК препаратів, одержаних на відпрацьованій після смаження м'яса олії (14–142 мкг/мл).

У роботі [4] ми зазначали, що, згідно літературних даних, аміноліпіди є ефективнішими антимікробними агентами порівняно з гліколіпідами і припустили, що однією з причин вищого рівня антимікробної активності ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, може бути посилення синтезу аміноліпідів в результаті активації НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази катіонами калію (натрію), наявними у складі технічного гліцерину.

З літератури [5, 6] відомо, що у процесі смаження в олії відбуваються хімічні реакції окиснення, гідролізу, ізомеризації та полімеризації, в результаті яких утворюються вільні жирні кислоти, низькомолекулярні спирти, альдегіди, кетони, лактони, вуглеводні, моно- та дигліцериди, транс-ізомери тощо. Після використання олія змінює свій склад та містить понад 30 % полярних сполук, що залежить від типу приготованої страви, способу смаження та кратності використання олії [5]. Цілком ймовірно, що утворювані під час смаження м'яса сполуки є потенційними інгібіторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, що супроводжується зниженням синтезу аміноліпідів, а отже, й антимікробної активності синтезованих ПАР.

У зв'язку з викладеним вище мета даної роботи – дослідження можливих причин різного рівня антимікробної активності поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на відпрацьованій після смаження м'яса і картоплі соняшниковій олії.

Матеріали і методи. Основний об'єкт досліджень – штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405, зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7405.

Як тест-культури під час визначення антимікробних властивостей ПАР використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3) і дріжджів (*Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccinii ІМВ В-7405 вирощували в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю використовували відпрацьовану після сма-

ження картоплі і м'яса олію (мережа ресторанів швидкого харчування Mcdonald's, Київ) у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену у середовищі наведеного складу з 0,5% відповідної олії. Інокулянт, в якому чисельність бактерій становила 10^4 – 10^5 кл/мл, вносили у кількості 10% від об'єму середовища.

Культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 проводили в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 5 та 7 діб.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини, екстраговані з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) як описано у наших попередніх роботах [1, 2].

Якісний аналіз поверхнево-активних ліпідів здійснювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 («Merck», Німеччина) у 4 системах розчинників: полярна система I – хлороформ–метанол–вода (85:15:1); полярна система II – хлороформ–метанол–вода (65:15:2); неполярна система III – гексан–діетиловий ефір (2:1); неполярна система IV – гексан–діетиловий ефір–оцтова кислота (90:10:1). Для ідентифікації ліпідних фракцій використовували специфічні реагенти: пластинки фарбували спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і парами йоду (нейтральні ліпіди), розчином нінгідрину (аміноліпіди), анісовим альдегідом і антроновим реактивом (гліколіпіди).

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясопептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів, як описано нами раніше [1, 2]. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР у першій пробірці, де був відсутній ріст.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 в рідкому середовищі, центрифугували (5000 g, 20 хв, 4°C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4°C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40с при 4°C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4°C), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ферментів визначали, як описано у нашій праці [7]. Активність фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2) встановлювали за швидкістю утворення пірувату, яку аналізували за окисненням НАДН при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) – за утворенням ФЕП та пірувату у процесі окиснення НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) – за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм.

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту

реакції у перерахунку на 1 мг білку. Вміст білку у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [8]. Активність ферментів аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано раніше [1, 2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Враховуючи результати наших попередніх досліджень [3], а також дані літератури [5, 6], на першому етапі досліджень аналізували залежність рівня антимікробної активності ПАР від якості пересмаженої соняшникової олії у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і тривалості культивування продуцента.

У табл. 1 наведено значення мінімальної інгібуючої концентрації щодо ряду умовно патогенних мікроорганізмів ПАР, утворюваних у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження м'яса і картоплі соняшниковій олії.

Встановлено, що незалежно від тривалості культивування, МІК щодо практично усіх досліджуваних тест-культур поверхнево-активних речовин, синтезованих на відпрацьованій після смаження м'яса олії, була суттєво вищою, ніж аналогічний показник ПАР, одержаних на відпрацьованій після смаження картоплі олії. Такі результати досліджень узгоджуються з одержаними раніше [3] про МІК ПАР щодо фітопатогенних бактерій.

Зазначимо, що збільшення тривалості вирощування штаму ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження м'яса олії з 5 до 7 діб супроводжувалося зниженням рівня антимікробної активності синтезованих ПАР: МІК щодо тест-культур (за винятком *S. aureus* БМС-1) підвищувалася в 1,8–7 разів (з 35–142 до 128–256 мкг/мл відповідно). У той же час, у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 упродовж 7 діб на відпрацьованій після смаження картоплі олії синтезувалися ПАР, мінімальна інгібуюча концентрація яких щодо досліджуваних бактерій (за винятком вегетативних клітин *B. subtilis* БТ-2 і *E. coli* ІЕМ-1) знижувалася порів-

Таблиця 1

Вплив якості відпрацьованої олії і тривалості культивування на антимікробну активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Олія після смаження	Тривалість культивування	МІК (мкг/мл) щодо тест-культур									
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Erwinia aroidae</i> Н-3	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2
м'яса	5	71	142	35	71	284	142	142	142	71	284
	7	256	256	256	128	128	256	256	256	256	Н.в
картоплі	5	22	44	22	88	88	88	176	44	44	Н.в
	7	64	32	32	32	64	64	16	16	32	128

Примітки: При визначенні МІК похибка не перевищувала 5 %. Н.в. – не визначали.

няно з встановленою для ПАР, одержаних на 5-ту добу культивування (32–64 і 44–176 мкг/мл відповідно).

Таким чином, антимікробна активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежить не тільки від якості відпрацьованої соняшникової олії, використуваної як джерело вуглецю та енергії, а й від тривалості культивування продуцента. Зазначимо, що у попередній роботі [4] нами також було встановлено залежність біологічних властивостей ПАР, синтезованих за умов росту штаму ІМВ В-7405 на очищеному й технічному гліцерині, від тривалості процесу.

Отже, властивості мікробних ПАР можуть змінюватися не тільки під час культивування продуцента на різних вуглецевих субстратах, а й у процесі вирощування на середовищі одного й того самого складу. У той же час існуючі технології виробництва практично цінних вторинних метаболітів являють собою періодичні процеси, орієнтовані на максимальний вихід цільового продукту. Оскільки в процесі культивування склад синтезованих метаболітів може змінюватися, немає гарантій одержати продукт з необхідними для практичного використання властивостями. Разом з тим, у доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про вплив тривалості культивування продуцента на біологічні властивості мікробних поверхнево-активних речовин.

Зазначимо, що з кожним роком кількість публікацій, присвячених дослідженню біологічних властивостей мікробних ПАР та потенційному застосуванню цих продуктів мікробного синтезу у медицині постійно збільшується [9–12]. Проте, у літературі є лише поодинокі повідомлення про антимікробні властивості поверхнево-активних речовин, синтезованих на промислових відходах [13, 14], у тому числі й олієвмісних [15, 16].

Так, ПАР, синтезовані за умов росту *Bacillus pumilus* DSVP18 на середовищі з подрібненим картопляним лушпинням (2 %), у концентрації 30–35 мкг/мл проявляли антимікробні властивості щодо різних штамів *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* та *Paenibacillus larvae* [13]. Ліпопептид, синтезований *Bacillus licheniformis* M104 на молочній сироватці (10 г/л), у концентрації 48 мкг/мл спричиняв антимікробну дію на *Staphylococcus aureus* ATCC 25928. Рамноліпід *Thermus thermophilus* НВ8 [15] і руфісан *Candida lipolytica* UCP0988 [16], синтезовані на олієвмісних відходах, пригнічували ріст *Micrococcus lysodeikticus* і представників роду *Streptococcus* і *Lactobacillus* відповідно.

Для визначення можливих причин різного рівня антимікробної активності ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження м'яса та картоплі олії упродовж 5 до 7 діб, на наступному етапі аналізували якісний склад одержаних в таких умовах культивування поверхнево-активних ліпідів (табл. 2). У попередніх дослідженнях [17] було встановлено, що за хімічним складом ПАР, синтезовані *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на гліцерині, є комплексом нейтральних, гліко- і аміноліпідів, причому нейтральні ліпіди представлені міколовими і *n*-алкановими кислотами, гліколіпіди – трегалозодіацелатами і трегалозоміколатами. Результати, наведені у табл. 2, засвідчують, що під час культивування штаму ІМВ В-7405 на відпрацьованій соняшниковій олії утворюється комплекс ПАР, у складі якого (на відміну від синтезованого на гліцерині), крім нейтраль-

них, гліко- та аміноліпідів, виявлені й фосфоліпіди, а серед гліколіпідів відсутні трегалозодіацелати. Крім того, комплекс ПАР, синтезований на відпрацьованій після смаження картоплі олії, містить більше аміноліпідів і не містить нейтральних ліпідів, на відміну від одержаного на олії після смаження м'яса.

Оскільки згідно літературних даних, саме аміноліпіди є відповідальними за антимікробні властивості мікробних ПАР [14], а нейтральним ліпідам такі властивості не притаманні, то саме різний склад комплексу ПАР, синтезованого на відпрацьованій після смаження картоплі олії, може зумовлювати його більш виражену антимікробну активність порівняно з комплексом ПАР, одержаним на олії після смаження м'яса.

Для підтвердження даних щодо хімічного складу ПАР (табл. 2) у подальших дослідженнях аналізували активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на пересмаженій олії різної якості (табл. 3).

Таблиця 2

Характеристика ліпідів, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій соняшниковій олії

Відпрацьована олія після смаження	Тривалість процесу, днів	Якісний склад			
		Гліколіпіди	Фосфоліпіди	Нейтральні ліпіди	Аміноліпіди
М'яса	5	Трегалозодиміколати Трегалозоміколати	Фосфатидилетаноламін	–	+
	7	Трегалозодиміколати Трегалозоміколати	Фосфатидилетаноламін	C ₁₃ -C ₁₈ -цис- <i>n</i> -алкенові і міколові кислоти	Сліди
Картоплі	5	Трегалозодиміколати	–	–	++
	7	Трегалозодиміколати Трегалозоміколати	Фосфатидилетаноламін	–	+++

Примітка: “–” – не виявлено.

Таблиця 3

Активність ферментів біосинтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій олії

Відпрацьована олія у середовищі культивування	Фаза росту	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білку)		
		ФЕП-карбоксикинази	ФЕП-синтетази	НАДФ ⁺ -залежної глутамат-дегідрогенази
Після смаження м'яса	середина експоненційної	1250±62	5000±250	833±41
	кінець експоненційної	1600±80	6400±320	476±23
Після смаження картоплі	середина експоненційної	400±20	3200±160	1600±80
	кінець експоненційної	500±25	3400±170	1905±95

Дані, наведені у табл. 3, засвідчують, що у процесі вирощування штаму ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів – була майже в 2–4 рази вищою, а активність ферментів біосинтезу гліколіпідів (ФЕП-карбоксікінази і ФЕП-синтетази) нижчою, ніж активність цих ферментів під час культивування бактерій на олії після смаження м'яса. Таким чином, результати ензиматичних аналізів дають змогу стверджувати, що різний рівень антимікробної активності ПАР, синтезованих на відпрацьованій після смаження картоплі і м'яса олії може бути зумовлений різним співвідношенням у їх складі гліко- і аміноліпідів.

З літератури [18, 19] відомо, що під час смаження картоплі та м'яса відпрацьована олія характеризується різним складом і, зокрема, містить різні токсичні речовини. Так, в результаті потрапляння катіонів заліза, що містяться у м'ясі, у пересмажену олію спостерігається підвищення ступеня її окиснення і термічної деградації [18]. Крім того, під час смаження м'яса утворюються токсичні гетероциклічні аміни [18, 19], які можуть бути інгібіторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази. Так, за наявності 10мМ 2,4-піридиндикарбоксилату (похідне гетероциклічного ароматичного аміну піридину) активність цього ферменту у *Aspergillus niger* NCIM 565 знижується у 2–4 рази [20, 21]. У той же час у роботі [22] зазначається, що 2,4-піридиндикарбоксилат є слабким інгібітором НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *Aspergillus terreus*. Зазначимо, що у доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про вплив похідних піридину на активність бактеріальних глутаматдегідрогеназ. Визначення дії гетероциклічних амінів на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vaccinii* ІМВ В-7405 буде предметом наших подальших досліджень.

Таким чином, результати даної роботи підтверджують одержані раніше [1, 3] дані про те, що заміна традиційних субстратів на відпрацьовану олію дає змогу не тільки здешевити процес біосинтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, а й отримати цільовий продукт з високою антимікробною активністю. Встановлена залежність антимікробного потенціалу ПАР від якості пересмаженої олії та тривалості процесу засвідчує необхідність проведення досліджень впливу умов культивування продуцентів на біологічні властивості синтезованих мікробних ПАР.

**Т.П. Пирог^{1,2}, Л.В. Никитюк¹, С.И. Антонюк¹,
Т.А. Шевчук², Г.А. Иутинская²**

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

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 НА ОТРАБОТАННОМ МАСЛЕ РАЗЛИЧНОГО КАЧЕСТВА И ИХ АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

Резюме

Цель. Исследование возможных причин различного уровня антимикробной активности поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405,

синтезированных на отработанном после жарки мяса и картофеля подсолнечном масле. **Методы.** ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2: 1). Критерием антимикробной активности ПАВ были минимальные ингибирующие концентрации (МИК), которые определяли методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (для бактерий) и жидком сусле (для дрожжей). **Результаты.** Установлено, что МИК по отношению к бактериям (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ИЕМ-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3) и дрожжам (*Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6) поверхностно-активных веществ, синтезированных *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на отработанном после жарки картофеля масле была в среднем в 2,5–8 раз ниже, чем соответствующий показатель ПАВ, полученных на отработанном после жарки мяса субстрате. Увеличение с 5 до 7 сут длительности выращивания *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на отработанном после жарки картофеля масле сопровождалось синтезом ПАВ, МИК которых по отношению к большинству исследованных тест-культур снижалась в 1,4–4 раза. Показатель минимальной ингибирующей концентрации ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 коррелировал с наличием в составе синтезированных ПАВ аминоклипоидов и активностью НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента их биосинтеза. **Выводы.** Установленная зависимость антимикробной активности ПАВ от качества пережаренного масла и длительности процесса свидетельствует о необходимости проведения исследований влияния условий культивирования продуцентов на биологические свойства целевого продукта. Данные о качественном составе ПАВ и активности ключевого фермента биосинтеза аминоклипоидов показывают возможность регуляции антимикробной активности поверхностно-активных веществ изменением условий культивирования продуцента.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, поверхностно-активные аминоклипоиды, антимикробные свойства, отработанное после жарки картофеля и мяса подсолнечное масло

T.P. Pirog^{1,2}, **L.V. Nikituk**¹, **S.I. Antonuk**, **T.A. Shevchuk**², **G.O. Iutynska**²

¹ National University of Food Technologies,
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

PECULIARITIES OF *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 SURFACTANTS SYNTHESIS ON WASTE OIL OF DIFFERENT QUALITY AND THEIR ANTIMICROBIAL PROPERTIES BY

Summary

Aim. To study possible reasons of different levels of antimicrobial activity of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants (surface-active substances, SAS) synthesized on waste after frying meat and potatoes sunflower oil. **Methods.** Surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2: 1). The criterion of surfactant antimicrobial activity were minimal inhibitory concentrations (MIC), which were determined by two-fold serial dilutions in a meat-peptone broth (for bacteria) and liquid wort (yeast). **Results.** It was established that MIC against bacteria (*Bacillus subtilis*

BT-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Proteus vulgaris* PA-12, *Staphylococcus aureus* BMS-1, *Pseudomonas* sp. MI-2, *Enterobacter cloacae* P-8, *Erwinia aroideae* H-3) and yeast (*Candida tropicalis* PE-2, *Candida albicans* D-6) of *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on waste after frying potatoes oil was on average 2.5–8 times lower than the corresponding index of SAS obtained on waste after frying meat substrate. The increase from 5 to 7 days of during *N. vaccinii* IMV B-7405 cultivation on waste after frying potatoes oil was accompanied by surfactant synthesis, MIC of which against most studied test cultures was decreased in 1,4–4 times. Index of minimum inhibitory concentration of *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactant correlated to the presence of aminolipids in SAS composition and activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase – a key enzyme of them biosynthesis. **Conclusions.** Dependence of surfactant antimicrobial activity on quality waste oil and processing duration indicates the need for research the influence of producer cultivation conditions on the biological properties of final product. Data on the qualitative composition of surfactant and the activity of key enzyme of aminolipids biosynthesis show the possibility of regulation of SAS antimicrobial activity by change of producer cultivation conditions.

Keywords: *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surface-active aminolipids, antimicrobial properties, waste after frying meat and potatoes sunflower oil

1. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. Food Bioprod. Proces. 2013; **91**(2): 149–157.
2. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac -5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. Food Bioprod. Proces. 2015; **93**(1): 11–18.
3. Pirog T.P., Nikituk L.V., Tymoshuk K.V., Shevchuk T.A., Iutynska G.O. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on fried sunflower oil]. Microbiol. Zh. 2016; **78**(2): 2–12. Ukrainian.
4. Pirog T.P., Nikituk L.V., Iutynska G.O. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on byproduct of biodiesel production]. Microbiol. Zh. 2016; **78**(5): 12–30. Ukrainian.
5. Zhang Q., Saleh A.S., Chen J., Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. Chem. Phys. Lipids. 2012; **165** (6): 662–681.
6. Bordin K., Kunitake M. T., Aracava K. K., Trindade C. S. F. Changes in food caused by deep fat frying – A review. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2013; **63** (1): 5–13.
7. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Beregova K.A., Kudrya N.V. [Peculiarities of glucose and glycerol metabolism in *Nocardia vaccinii* IMVB-7405]. Ukr. Biochem. J. 2015; **87**(2): 66–75. Ukrainian.
8. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; **72**(3): 248–254.
9. Santos D.K., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Biosurfactants: multi-

- functional biomolecules of the 21st century. Int. J. Mol. Sci. 2016; **17** (3): doi: 10.3390/ijms17030401.
10. Gudiña E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. Mar. Drugs. 2016; **14** (2): doi: 10.3390/md14020038.
 11. Das P., Yang X.P., Ma L.Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. Front. Microbiol. 2014; **5**: doi: 10.3389/fmicb.2014.00696.
 12. Kiran G.S., Ninawe A.S., Lipton A.N., Pandian V., Selvin J. Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. Crit. Rev. Biotechnol. 2015: doi:10.3109/07388551.2014.979758.
 13. Sharma D., Ansari M.J., Gupta S., Al Ghamdi A., Pruthi P., Pruthi V. Structural characterization and antimicrobial activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus pumilus* DSVP18 grown on potato peels. Jundishapur J. Microbiol. 2015; **8**(9): doi: 10.5812/jjm.21257.
 14. Goma E.Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. Braz. Arch. Biol. Technol. 2013; **56**(2): 259–268.
 15. Pantazaki A.A., Dimopoulou M.I., Simou O.M., Pritsa A.A. Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010; **88**(4): 939–951. doi: 10.1007/s00253-010-2802-1.
 16. Rufino R. D., Luna J. M., Sarubbo L. A. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Coll. Surf. B. Biointerfaces. 2011; **84**(1): 1–5. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.045.
 17. Pirog T.P., Grytsenko N.A., Homyak D.I., Konon A.D., Antonuk S.I. [Optimization of synthesis of biosurfactants of *Nocardia vaccinii* K-8 under bioconversion of biodiesel production waste]. Microbiol. Zh. 2011; **73**(4): 15–24. Russian.
 18. Choe E., Min D.B. Chemistry of deep-fat frying oils. J. Food Sci. 2007; **72**(5): R77–86.
 19. Totani N., Ono M., Burenjargal M., Ojiri Y. Carbonyl compounds vaporize from oil with steam during deep-frying. J. Oleo Sci. 2007; **56**(9): 449–456.
 20. Noor S., Puneekar N.S. Allosteric NADP-glutamate dehydrogenase from aspergilli: purification, characterization and implications for metabolic regulation at the carbon-nitrogen interface. Microbiology. 2005; **151**:1409–1419. doi: 10.1099/mic.0.27751-0.
 21. Choudhury R., Noor S., Varadarajalu L.P., Puneekar N.S. Delineation of an *in vivo* inhibitor for *Aspergillus* glutamate dehydrogenase. Enzyme Microb. Technol. 2008; **42**(2): 151–159. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.08.011.
 22. Choudhury R., Puneekar N.S. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli*. Mycol. Res. 2009; **113**(Pt 10): 1121–1126. doi: 10.1016/j.mycres.2009.07.009.

Отримано 21.06.2016