

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

ДИПЛОМНА РОБОТА

на тему: **“Оптимізація умов синтезу поверхнево активних вторинних метаболітів морськими ізолятами бактерій родів *Pseudomonas* та *Bacillus*”**

*“Optimization of conditions for synthesis of surfactant secondary metabolites by marine isolates of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*”*

Студентки IV курсу
денної форми навчання
Спеціальність 162 “Біотехнології та
біоінженерія”
Кебап Марії Вячеславівни

Керівник: канд. біол. наук
Галкін Микола Борисович

Оцінка за шкалами:
національною _____
ECTS _____ Кількість балів: _____

Члени комісії

Протокол засідання кафедри

№ _____ від « _____ » _____ 2021 р.

_____	_____
(підпис)	(прізвище та ініціали)
_____	_____
(підпис)	(прізвище та ініціали)
_____	_____
(підпис)	(прізвище та ініціали)

Одеса - 2022

АНОТАЦІЯ

Роботу було проведено на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова і присвячено оптимізації умов синтезу вторинних метаболітів морських бактерій, а саме синтезу піоціаніну та рамноліпідів штамами *Pseudomonas aeruginosa* та синтезу поверхнево активних речовин штамами *Bacillus subtilis*. Виявилось, що на вихід цікавих для нас вторинних метаболітів впливає вибір та концентрації джерел вуглецю, азоту, фосфору, солей та значення рН, температури, швидкості перемішування, магнітного поля та інше. Через великий розбіг властивостей штамів в роботі були наведені діапазони, що включають оптимальні значення для більшості штамів *P. aeruginosa* та *B. subtilis*, з якими проводили оптимізацію сучасні дослідники.

Роботу викладено на 38 сторінках, вона містить 7 рисунків. Наведено посилання на 53 джерела літератури (2 кирилицею та 51 латиницею).

Ключові слова: *Pseudomonas*, *Bacillus*, оптимізація, вторинні метаболіти, рамноліпіди, піоціанін.

The work was carried out in the Microbiology, Virology and Biotechnology Department I. I. Mechnikov National University; optimization of conditions of marine bacterias secondary metabolites synthesis, specifically — synthesis of piocyanine and rhamnolipids by strains of *Pseudomonas* and *Bacillus*. It turned out that the choice and concentration of sources of carbon, nitrogen, phosphorus, salts and pH, temperature, stirring rate, magnetic field, etc. affect the yield of secondary metabolites. Due to the large divergence of the strains properties — ranges that include optimal values for most strains were given in the results.

Diploma thesis is expounded on 38 pages, it contains 7 figures. It provides links to 53 references (2 cyrillic and 51 latinic).

Key words: *Pseudomonas*, *Bacillus*, optimization, secondary metabolites, rhamnolipids, pyocyanin.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Особливості та різноманітність морських бактерій.....	7
1.2. Метаболізм і вторинні метаболіти морських бактерій.....	8
1.3. Перспектива використання вторинних метаболітів бактерій роду <i>Pseudomonas</i> та <i>Bacillus</i>	10
1.4. Пігмент піоціанін.....	12
1.5. Біосурфактанти.....	13
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	16
2.1. Мікроорганізми, які використовувались в роботі.....	16
2.2. Поживні середовища та технологічна схема.....	17
2.3. Методи оптимізації умов та компонентів синтезу.....	19
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	21
3.1. Оптимізація умов синтезу піоціаніну.....	21
3.2. Оптимізація умов синтезу біосурфактантів.....	24
ВИСНОВКИ.....	32
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	33

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

RSM — response surface methodology

PBD — Plackett-Burman design, метод Плакетта-Бермана

LB — поживне середовище Лурі-Бертані

RMF — обертове магнітне поле

SMF — статичне магнітне поле

ВСТУП

Останні десятиліття ознаменувалися численними відкриттями біомолекул морських бактерій, які здавна вважалися метаболітами морських тварин. Екстремальне середовище проживання та конкуренція змусила морських бактерій мати генетичну здатність продукувати унікальні вторинні метаболіти, різноманітні за структурою класи біоактивних речовин з високим біотехнологічним потенціалом.

Морські бактерії характеризуються величезною різноманітністю і перспективністю, але вже довгий час відсутня достатня кількість знань про них та синтез їх метаболітів. Вторинні метаболіти морських бактерій — низькомолекулярні біоактивні сполуки, різноманітні за фізіологічними функціями [Андрюков, 2018]. Вони відіграють ключову роль в життєдіяльності бактерій морського середовища і впроваджують стратегії їх виживання у несприятливих умовах, діючи як медіатори і засоби міжклітинного спілкування, а головне для нас — проявляють високу біологічну активність різного напрямку: антибактеріальну, протигрибкову, антивірусну, антиопухолеву, ферментну та ін. [Mondol et al., 2013].

Незважаючи на доволі високу токсичність вторинних метаболітів морських бактерій, багато з цих речовин широко використовуються наразі у фармакології, косметичі, харчовій промисловості, сільському господарстві, для захисту рослин, для біоремедіації, виробництва біоповерхнево-активних речовин та хімічних реактивів [Ruocco et al., 2017].

Біосурфактанти мають широкий спектр біологічної дії та викликають великий інтерес в промисловості, біотехнології, біоремедіації завдяки своїм властивостям знижувати поверхневий натяг, збільшувати розчинність і піноутворення тому використовуються в багатьох виробництвах [Irfan-Maqsood et al., 2004].

Пігмент піоціанін також є речовиною широкого спектру дії, який знаходить застосування через прояв потужної протигрибкової,

антибактеріальної, антиоксидантної, протиоухолевої активностей. Піоціанін придатний для стримування бактерій, грибів і найпростіших у сільськогосподарському та фармацевтичному застосуванні, для зменшення деградації сирої нафти і для кількісного визначення концентрації іонів амонію [Giddens et al., 2009]. В промисловості сполуки феназину використовують для знебарвлення барвників та виготовлення харчових барвників [Saha et al., 2008].

Важливою сучасною потребою є пошук нових більш екологічних і дешевих джерел ресурсів, необхідних науці та виробництву, а також пошук способів отримання більшої кількості продукту з якомога меншого об'єму з меншими матеріальними та часовими витратами.

Об'єктом даного дослідження є синтез вторинних метаболітів морськими бактеріями. Предметом вважається синтез біосурфактантів, пігменту піоціаніну, морськими бактеріями родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, в першу чергу представниками виду *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus subtilis*.

Метою роботи було оптимізувати умови та компоненти поживного середовища для синтезу вторинних метаболітів штамами згаданих бактерій. Відповідно до зазначеної мети, в роботі були поставлені наступні задачі:

- дослідження літератури та визначення оптимальних поживних середовищ для синтезу біосурфактантів та піоціаніну
- визначення компонентів, поживних добавок, солей та їх оптимальних концентрацій, що призводять до найвищого виходу бажаних вторинних метаболітів
- визначення оптимальних параметрів умов культивування (температура, рН, аерація, магнітні поля і т.д.).

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості та різноманітність морських бактерій

Основні види бактерій, що знаходяться в морській воді, належать до родів *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp. та *Micrococcus* sp. [Baharum et al., 2010]. Деякі бактерії (такі як *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* та ін.) синтезують екзотоксини, які є вторинними метаболітами та викликають захворювання у людини [Pinu et al., 2017]. Проте багато вторинних метаболітів бактерій викликають інтерес науковців щодо їх використання в промисловості та інших галузях. Види бактерій з цікавими вторинними метаболітами наразі все більше досліджуються.

Більшість морських бактерій схильні до екстремальних умов середовища. На життєдіяльність бактеріальних клітин впливають коливання температури Світового океану, освітленість і тиск, який вони відчують на різних глибинах, циркуляція води, газовий обмін, солоність навколишнього середовища і наявність в ній органічних і мінеральних речовин [Андрюков, 2018]. Всі ці чинники змусили бактерій розвивати унікальні властивості і здатність до біосинтезу речовин з незвичайними характеристиками.

Також специфічне морське середовище і підвищена потреба в хімічній регуляції міжвидових і внутрішньовидових відносин вплинули на особливості хімічної будови вторинних метаболітів морського походження. Багато дослідників відзначають здатність морських організмів утилізувати деякі розчинені у воді компоненти і включати їх до складу своїх метаболітів. До таких компонентів належать галогени, перш за все бром, а також сульфат-аніон [Громов, 1989].

Мешкаючи в товщі води бактеріальні клітини можуть постійно обмінюватися своїми метаболітами. Так само більшість морських бактерій філогенетично значно давніші організмів суші. На відміну від своїх наземних

еквівалентів морські бактерії повинні відрізнятися фізіологічними, біохімічними та молекулярними властивостями. [Siddharth et al., 2018]. Таким чином, морські бактерії є, мабуть, найбільш перспективними мікроорганізми для виявлення нових молекул з антибактеріальними властивостями.

Як правило, кожен вид морських бактерій виробляє кілька антибіотиків, профіль яких залежить від роду мікроорганізму. Наприклад, на сьогодні з роду *Actinobacteria* [Gokulan et al., 2014] виявлено понад 5000 антибіотиків, вторинних метаболітів, включаючи традиційні антибіотики, виявлені в 1950–1960-х роках, а також нові. За прогнозами, ці бактерії можуть виробляти до 150 000 різних хімічних протимікробних агентів [Wang et al., 2018].

1.2. Метаболізм і вторинні метаболіти морських бактерій

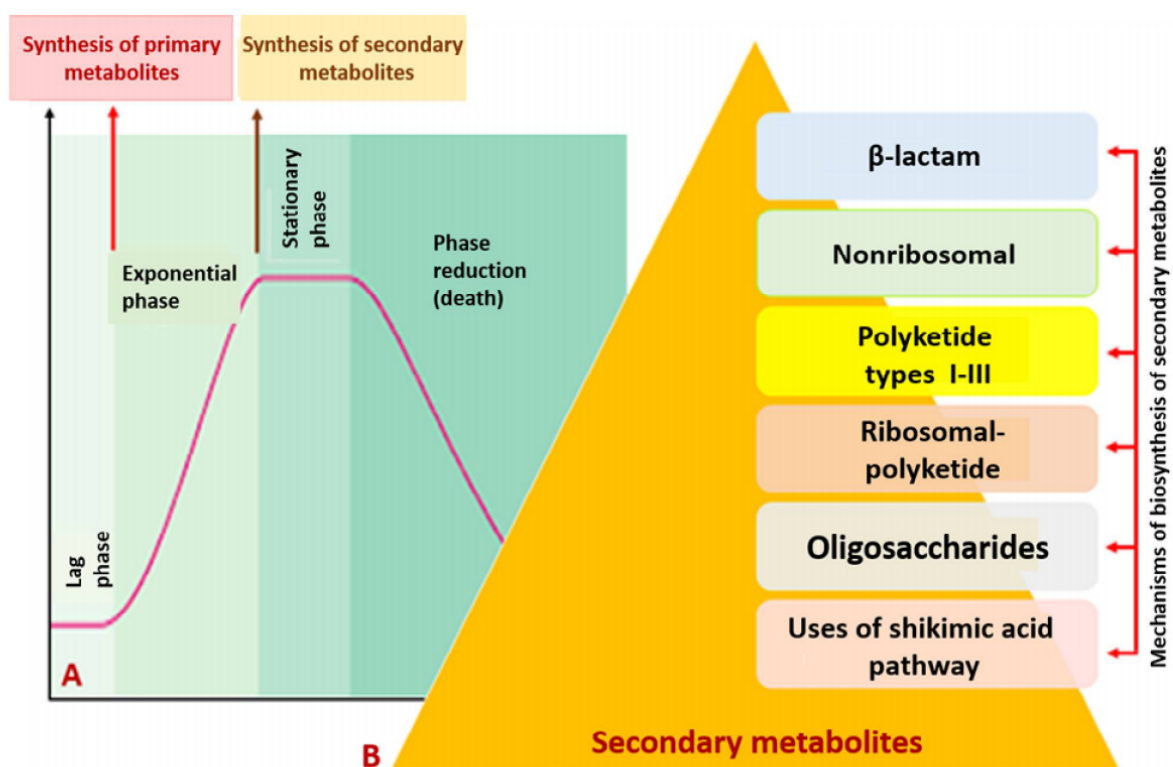
Вторинні метаболіти є продуктами реакцій, що каталізуються ферментами. Це низькомолекулярні біоактивні сполуки, різноманітні за структурою та фізіологічними функціями. Вони впроваджують стратегії виживання бактерій у несприятливих умовах, діючи як медіатори, посередники із зовнішнім середовищем і засоби міжклітинного спілкування [Wang et al., 2018]. Кінцеві продукти метаболізму, будучи невеликими пептидними молекулами, використовуються як субстрати для біохімічних реакцій або використовуються мікроорганізмами для підтримки їх життєвих процесів [Pinu et al., 2017].

Метаболіти являють собою широкий спектр молекул, надзвичайно різноманітних за своїми структурами та функціями, зі своїми зареєстрована кількість перевищує 25000, що становить менше 2% від загальної кількості природних метаболітів мікроорганізмів, поки що не доступні для дослідження [Niu et al., 2013].

Метаболіти підтримують життєві процеси морських бактерій, які одночасно є багатими джерелами цих сполук. Близько 70% виявлених вторинних метаболітів морських бактерій представлені нерибосомальними

пептидами (NRP) або змішаною полікетидно-нерибосомальною групою пептидів із різноманітною біологічною активністю, які синтезуються протягом життєвого циклу морських мікроорганізмів. Як правило, ці метаболіти виявляють широкий спектр біологічної активності (протимікробну, протипухлинну, противірусну та протигрибкову), різноманітні фармакологічні властивості та надзвичайно високу структурну різноманітність [Singh et al., 2017]. Вони представлені різними ліпопептидами, поліпептидами, макролактонами, жирними кислотами, полікетидами, ліпоамідами та ізокумаринами і є циклічними розгалуженими пептидними сполуками з незвичною структурою та структурними шаблонами нових природних антибіотиків. Це різноманітні агенти, екзотоксини, металеві носії, гормони, імуномодулятори, пігменти та інгібітори ферментів [Gokulan et al., 2014].

Рис. 1. Синтез вторинних метаболітів морських прокариот [Baral et al., 2018]



Встановлено, що активна стадія синтезу молекул метаболіту у мікроорганізмів відбувається в кінці експоненціального і на початку стаціонарної фази їх зростання (рис. 1.). Їх виробництво індукується

виснаженням поживних речовин, несприятливими умовами середовища, згрупованими генами, що відповідають за біосинтез вторинних метаболітів разом у невеликій кількості скупчень.

Більшість досягнень з біотехнології в останні десятиліття присвячені отриманню нових антибіотичних засобів із вторинних метаболітів морських бактерій. Ці дослідження засновані на розкритті механізму синтезу основних мікробних класів метаболітів за допомогою полікетидсинтази, нерибосомної пептидсинтетази, які є біосинтетичними шляхами і широко використовуються морськими мікроорганізмами для отримання антимікробних речовин.

Більшість морських бактерій та інших мікроорганізмів використовують численні кластери генів для біосинтезу метаболітів [Das et al., 2008]. Дослідження послідовностей геному показали, що значна їх частина відповідає за біосинтез вторинних метаболітів. Наприклад, серед морських мікроорганізмів ізоляти роду *Bacillus* відносяться до філогенетично гетерогенним групам морських бактерій. Їм потрібно багато поживних речовин і місця, і, щоб конкурувати з іншими бактеріями, вони синтезують значну кількість вторинних метаболітів з вираженою антимікробною активністю, що кодується генами, складовими до 8% геному [Chen et al., 2017].

1.3. Перспектива використання вторинних метаболітів бактерій роду *Pseudomonas* та *Bacillus*

Вторинні метаболіти, проявляючи високу біологічну активність, продемонстрували свій величезний потенціал для використання у фармакології (медичні та ветеринарні терапевтичні препарати), в косметичі, в якості природних консервантів продуктів в харчовій промисловості та сільському господарстві, в якості фітосанітарних засобів для захисту рослин.

Ряд морських бактерій представляє великий біотехнологічний інтерес для біоремедіації, виробництва біоповерхнево-активних речовин та біохімії “психрофільних” ферментів. Особливість в тому, що синтезуються вони

мікроорганізмами, пристосованими до низьких температур. Тому ці речовини мають високий потенціал стосовно біотехнологічних застосувань у мийній промисловості та для виробництва хімічних реактивів.

Види *Pseudomonas*, як правило, продукують ряд добре вивчених вторинних метаболітів, наприклад, рамноліпіди, феназини, піовердини або сирінгафактини [Tiso et al. , 2017].

Незважаючи на свої антимикробні та інші комерційні значущі властивості, є повідомлення, що бактерія *P. aeruginosa* є відомим збудником природи, що викликає різні проблеми зі здоров'ям, особливо у госпіталізованих пацієнтів [Arancibia et al. , 2002].

Представники *Pseudomonas* все частіше використовуються для біотехнологічних застосувань, зокрема, психро- і галофільних, а також гідрокарбонокластичних і стійких до важких металів бактерій. Наприклад, *Pseudomonas bauzanensis* може впоратися з токсичними забрудненнями.

Бактерії *Pseudomonas pertucinogena* легко культивуються і синтезують природні продукти, такі як ектоїн, петруцин або біоемульгатори, навіть із вуглеводневими забрудненнями або штучними полімерами як альтернативними джерелами вуглецю, що сприяє економії природних ресурсів [Wierckx et al., 2015]. Ектоїни виробляються біотехнологічно, напр. з *Halomonas* spec., і використовуються як зволожуючі інгредієнти в косметичці [Yin et al., 2015].

Біоемульгатори та біоповерхнево-активні речовини *Pseudomonas* вважаються цікавими для біотехнологічних застосувань як миючі засоби, емульгатори у споживчих продуктах, для фармацевтичних або екологічних цілей [Gudina et al., 2016]. Науковці припускають, що в галузі виробництва біоповерхнево-активних речовин або біоемульгаторів будуть активно використовуватися саме бактерії, мешкаючі у забруднених нафтою середовищах [Satpute et al., 2010].

Бактеріальні сполуки для зберігання вуглецю — метаболіти *Pseudomonas* sp., а саме триацилгліцерини або складні ефіри воску та полігідроксиалканоати,

також представляють інтерес для біотехнології, причому останні сполуки розглядаються як природна альтернатива звичайним поліефірним матеріалам, отриманим з нафти [Narancic, 2017]. Морські види *Pseudomonas pertucinogena*, таким чином, можуть адаптувати вироблення метаболітів, що зберігається вуглецем, до відповідних умов навколишнього середовища [Alvarez et al., 2016].

1.4. Пігмент піоціанін

Природні пігменти отримують і використовують дуже давно, але інтерес до них не такий високий через проблеми з токсичністю. Бактеріальні джерела є доброю альтернативою для різних вигідних застосувань у медицині, промисловості, сільському господарстві та для довкілля [Rao et al., 2017].

У *P. aeruginosa* знайдено чотири пігменти, що виробляють різноманітні окислювально-відновні сполуки феназину. Такими є піоціанін (синій), піоверидин — він же флуоресцеїн (жовто-зелений), піорубін (червоний) і піомеланін (коричневий) [Krieg et al., 2010].

Приблизно від 90 до 95% штамів *P. aeruginosa* виробляють піоціанін. Піоціанін (5-N-метил-1-гідроксифеназин) — це синьо-зелений водорозчинний феназиновий пігмент, що виробляється у великих кількостях активними культурами *Pseudomonas aeruginosa* [Blankenfeldt et al.,]. Відомо, що цей пігмент синтезується на пізній стаціонарній фазі і фарбує середовище у характерний синьо-зелений колір.

Піоціанін є пігментом широкого спектру дії, який знаходить застосування через прояв потужної протигрибкової, антибактеріальної, антиоксидантної, протиохолевої активностей. Піоціанін придатний для стримування бактерій, грибів і найпростіших у сільськогосподарському та фармацевтичному застосуванні [Giddens et al., 2009]. Повідомляється про необхідність використання піоціаніну для запобігання симптомам захворювання у рослин, в боротьбі з пестицидами та нематодами. Пігмент у ґрунті сприяє безпосередньому росту рослин і захищає рослини від фітопатогенів [Mercado et

al., 2007]. Протигрибкова активність зумовлена здатністю піоціаніну зупиняти ланцюг транспорту електронів грибів [Kerr et al., 1999].

Цей вторинний метаболіт здатний окислювати та відновлювати інші молекули і, отже, вбивати мікроби, що конкурують з *P. aeruginosa*, а також клітини легенів, наприклад коли *P. aeruginosa* інфікує під час муковісцидоз. Оскільки піоціанін є цвітеріоном при рН крові він легко проникає через клітинну мембрану [Hassan et al., 1980]. В медицині піоціанін інгібує активну проліферацію лімфоцитів людини [Nakaike et al., 2005]. Розробка синтетичних протипухлинних похідних феназину є стабільним напрямком досліджень, що спрямовані на поєднання відомої біологічної активності феназину з підвищеною специфічністю щодо ракових клітин [Hari et al., 2009].

В промисловості сполуки феназину використовують для знебарвлення барвників та виготовлення харчових барвників [Saha et al., 2008]. Його також можна використовувати для зменшення деградації сирої нафти і для кількісного визначення концентрації іонів амонію.

Потенційне використання цього пігменту піоціаніну спонукає до пошуку удосконалених методів виробництва. Наразі піоціанін є дорогою речовиною.

1.5. Біосурфактанти

Майже всі поверхнево-активні речовини, які зараз використовуються, хімічно отримують з нафти. Проте біоповержнево-активні речовини мають ряд переваг перед хімічними поверхнево-активними речовинами. Це нижча токсичність, вища здатність до біологічного розкладання, краща сумісність з навколишнім середовищем, вище піноутворення, висока селективність і питома активність за екстремальних температур, рН і солоності, а також здатність синтезуватися з відновлюваної сировини.

Біоповержнево-активні речовини являють собою низькомолекулярні поверхнево-активні сполуки, які виробляються бактеріями, дріжджами та грибами і мають амфіфільну природу. Вони зменшують поверхневий натяг на

межі розділу повітря-вода та міжфазний натяг на поверхнях розділу фаз, наприклад нафта-вода [Satpute et al. 2010].

Майже всі поверхнево-активні речовини, які зараз використовуються, хімічно отримують з нафти. Проте біоповержнево-активні речовини мають ряд переваг перед хімічними поверхнево-активними речовинами, таких як нижча токсичність, вища здатність до біологічного розкладання, краща сумісність з навколишнім середовищем, вища піноутворення, висока селективність і питома активність при екстремальних температурах, рН і солоності, а також здатність синтезуватися з відновлюваної сировини.

Сурфактин є сильною поверхнево-активною сполукою, при концентрації 0,05% поверхневий натяг води знижується з 72 мН/м до 27 мН/м. Велика кількість корисних фізико-хімічних, біологічних та фізіологічних властивостей цієї речовини свідчить про те, що вона може широко використовуватись у фармацевтиці, технічних та природоохоронних областях. Емульгуючі властивості сурфактину використовують для виділення із забруднених середовищ ксенобіотичних сполук та посилення їх біологічної деградації або для полегшення видобутку нафти з карбонатних пластів.

Існує багато функцій рамноліпідів, через які вони активно синтезуються *Pseudomonas aeruginosa*. Від виробництва рамноліпідів залежить поглинання гідрофобних субстратів, що надає *Pseudomonas aeruginosa* здатність метаболізувати різноманітні субстрати, включаючи всіляки олії, н-алкани, гексадекани. Припускається, що секретовані *Pseudomonas aeruginosa* рамноліпіди емульгують субстрат і дозволяють йому поглинатися клітиною бактерії. Також існують докази того, що рамноліпіди мають високу адсорбцію на поверхні клітин *Pseudomonas aeruginosa*, через що вона стає гідрофобною [Yuan et al., 2007]. Доказано, що рамноліпіди мають антимікробну дію проти ряду бактерій, вірусів, грибів та зооспор. І саме рамноліпіди є ключовим фактором вірулентності синьогнійної палички. Завдяки своїм властивостям рамноліпіди знижують поверхневий натяг середовища *Pseudomonas aeruginosa*,

що дозволяє клітині роїтися, тобто синтез рамноліпідів забезпечує рух бактерії [Glick et al., 2010]. Тим же чином пригнічується прикріплення, що запобігає щільному прилипанню клітин до субстрату. Це допомагає в утворенні біоплівки. Під час розвитку біоплівки рамноліпіди створюють спеціальні рідинні канали для потоку води та газів навколо самої біоплівки і підтримують ці канали. Отже робимо висновок наскільки рамноліпіди важливі для формування структури в біоплівках [Davey et al., 2003].

Рамноліпіди синьогнійної палички мають широкий спектр біологічної активності та викликають великий інтерес в промисловості та біотехнології. Поверхнево-активні речовини користуються попитом у широкому спектрі промислових застосувань, завдяки своїм властивостям знижувати поверхневий натяг, збільшувати розчинність і піноутворення тому використовуються в багатьох виробництвах [Irfan-Maqsood et al., 2004]. Рамноліпіди ефективні в біоремедіації органічних і важких металів різних забруднених ділянок, наприклад ґрунту [Mulligan et al., 2005] і в підвищенні нафтовіддачі [Wang et al., 2007]. За потрібне додати, що рамноліпіди є джерелом рамнози, яка сама по собі є дорогим цукром [Linhardt et al., 1989].

Витрати на виробництво біоповерхнево-активних речовин на жаль не дозволяють їм конкурувати зі своїми синтетичними аналогами. Використання дешевших субстратів є найважливішим фактором виробництва в цьому конкурентному середовищі, і тому сучасні дослідження біосурфактантів зосереджені на підвищенні врожайності та зниженні вартості виробництва. Біоповерхнево-активні речовини можна виробляти з промислових відходів, а це означає, що можливе дешевше виробництво. Крім того, використання відходів зменшує їх забруднюючий вплив на природу.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікроорганізми, які використовувались в роботі

Штами виду *Bacillus subtilis* частіше за все досліджували на виробництво сурфактину. *Bacillus subtilis* — грам-позитивна аеробна бактерія, що утворює ендоспори, продуцентом деяких пептидних антибіотиків, біосурфактантів та ферментів, достатньо модельний організм для дослідження. В роботі зазначені штами виду *Bacillus subtilis* AB01335-1 та AB02238-1.

Рід *Pseudomonas* значний час були відомі як перші та єдині бактерії, що синтезують феназинові пігменти [Schoonbeek et al., 2012]. Але феназини виробляються й різними іншими продуцентами, включаючи *Streptomyces*, *Actinomycetes*, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio*, *Pelagibacter* та іними. Проте представники роду *Pseudomonas* залишається достатньо вивченими та комерційно цінними організмами. Особливо синьогнійна паличка, котра, як було зазначено вище проявляє різноманітну біологічну активність. Обраний вид зумовлений експериментально вищими показниками виходу піоціаніну та рамноліпідів.

Pseudomonas aeruginosa — це достатньо поширена грамнегативна, аеробна, високорезистентна паличкоподібна бактерія, яка може викликати захворювання, особливо у людей з низьким імунітетом. Вона зустрічається у ґрунті, воді, антропогенних середовищах і навіть в середовищах з низьким вмістом кисню [Diggle et al., 2020].

Важливо зазначити, що вид *Pseudomonas aeruginosa* має величезну та різноманітну кількість штамів. Цей факт виявився великою перешкодою оптимізувати умови культивування, компоненти середовища та їхні концентрації для загалом усього виду, через великий розбіг властивостей штамів. З цієї причини автори досліджень з оптимізації неодноразово попереджають про те, що їх результати стосуються лише зазначених в роботі штамів і перші не розповсюджуються на весь вид.

Перелік штамів, що будуть наведені в даній роботі: *Pseudomonas aeruginosa* RT; P21; PA14; DN9; NEJ01R; MTCC 5210; SPC B 65; NRRL B-771; ATCC 15692; PAO1; MM1011; CGA1; OG1; UG2; NY3; san-ai; PG 201, 65E12, UO 287, UO 29, 59C7 та інші.

2.2. Поживні середовища та технологічна схема

Не існує якогось загального середовища для виробництва вторинних метаболітів штамми *Pseudomonas* та *Bacillus*, оскільки знов таки різні штамми мають свої особливі потреби в харчуванні залежно від своїх властивостей.

Але наявні середовища, з якими працюють частіше за все в напрямку синтезу піоціаніну та рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa*. До того ж перелічені нижче поживні середовища використовувалися в дослідженнях з оптимізацій цього процесу.

Середовище King's A містить панкреатичний гідролізат желатину, що виступає джерелом поживних речовин, необхідних зростанню мікроорганізмів: азоту, вітамінів, мінеральних солей і амінокислот. Калію сульфат та магнію хлорид у середовищі постачають катіони для активації синтезу піоціаніну та збільшують вихід цього пігменту. Гліцерин — якісне джерело вуглецю.

Середовище LB містить пептиди та пептони казеїну, вітаміни, у тому числі вітаміни групи B, мікроелементи (азот, сірка, магній). Джерелом пептидів та пептонів є триптон. Вітаміни та мікроелементи містяться в екстракті дріжджів. Іони натрію, необхідні для транспорту та осмотичного балансу, додають до складу середовища у вигляді хлориду натрію. Триптон також є джерелом незамінних амінокислот.

Середовище Hiss та MPB, збагачений 5% глюкозою також використовувались в синтезі піоціаніну, але показали не настільки втішні результати.

Середовище MSM (мінеральне сольове середовище) характеризується широким спектром різноманітних солей. Наведене в роботі поживне

середовище містило такий склад та концентрації: 4 г NH_4NO_3 , 4,08 г KH_2PO_4 , 5,68 г Na_2HPO_4 , 4 г CaCl_2 , 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,49 \times 10^{-3}$ г динатрієвої солі етилендіамінтетраацетату (натрій EDTA) і $5,56 \times 10^{-4}$ г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Джерелом вуглецю в середовищі виступала додана олія.

Середовище PPAS (фосфатно-обмежена протеоза пептон-амонійна сіль) містило пептон (10 г) в якості джерела азоту та оливкову олію в якості джерела вуглецю. До того ж поживне середовище містить різноманітні солі та добавки, а саме: 1,07 г NH_4Cl , 1,49 г KCl , 14,54 г Tris HCl , 0,20 г MgSO_4 .

2.3. Методи оптимізації умов та компонентів синтезу

Оптимізація живильних середовищ для виробництва будь-яких вторинних метаболітів бактерій є складним завданням, тому що біотехнолог ставить перед собою завдання отримати максимальний вихід продукту з мінімальними витратами. Вирішальне значення має створення оптимального середовища для вирощування біомаси, оскільки саме склад середовища відіграє першорядну роль у виході продукту.

Рис. 2. Технологічна схема синтезу піоціаніну

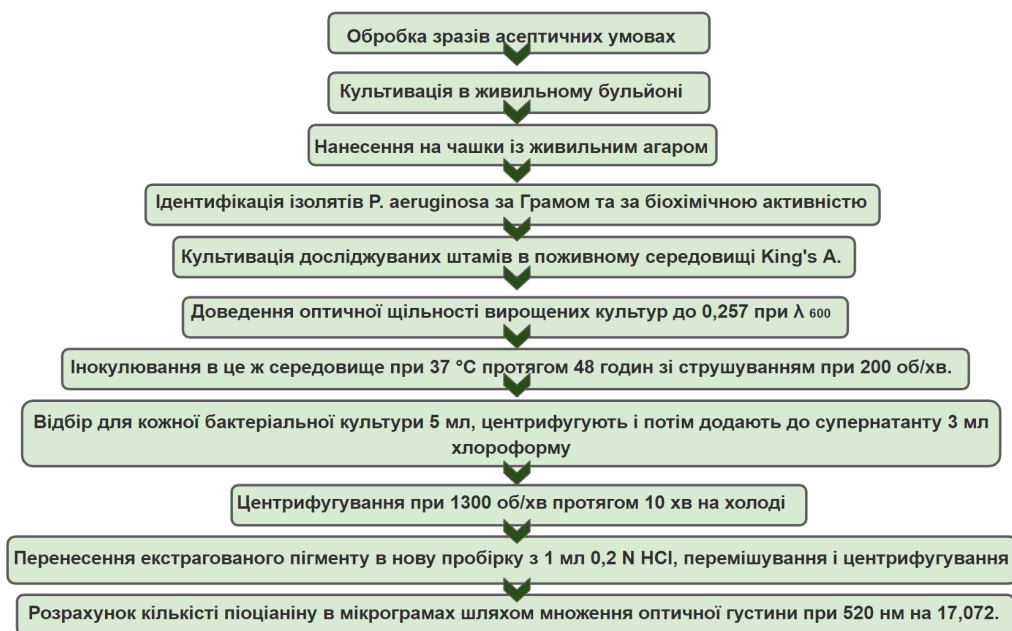
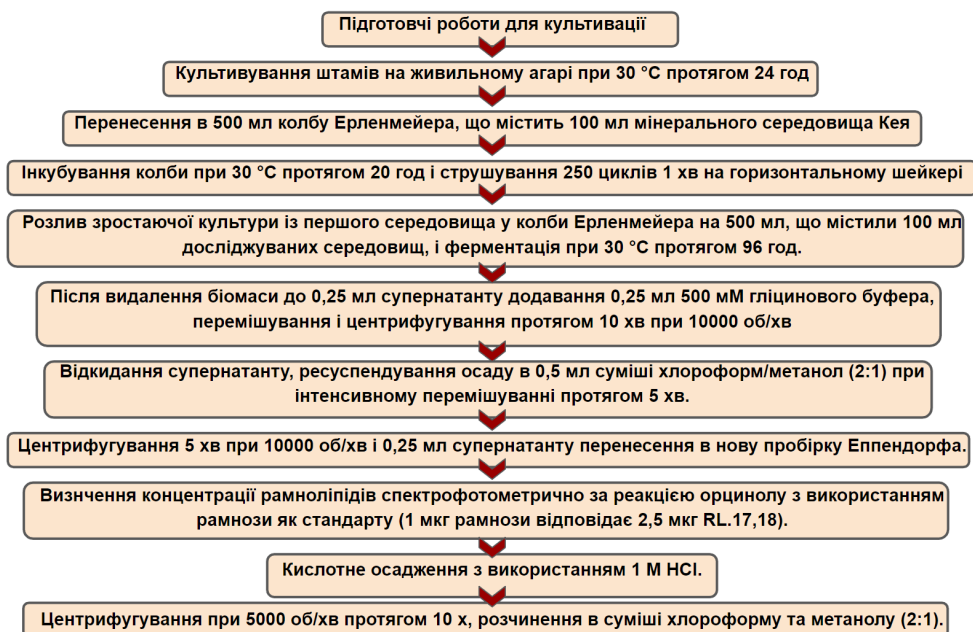


Рис. 3. Технологічна схема синтезу рамноліпіду



Оптимальне середовище означає, що воно містить усі необхідні для синтезу метаболіту компоненти і не менш важливо - в збалансованій концентрації. Безумовно важливою частиною оптимізації є визначення та підтримка параметрів необхідних синтезу умов (температура, рН, аерація, чи ін.). Багатофакторні статистичні підходи допомагають у визначенні компонентів середовища та інших умов, які призводять до оптимального виходу необхідних нам вторинних метаболітів.

Для пошуку оптимальних умов чи компонентів знадобилася б надто велика кількість експериментальних спроб, що не є доцільним. Тому для оптимізацій використовують математичні методи, які надають статистичні моделі, які допомагають зрозуміти взаємодію між параметрами процесу на різних рівнях.

Наприклад, план Плакетта-Бермана (PBD) - статистичний підхід для скринінгу, що дозволяє суттєво збільшити кількість застосовуваних факторів, одночасно з цим різко скорочуючи кількість дослідів. Він використовувався в

більшості оптимізацій різних факторів, які суттєво впливають на вироблення метаболіту, наприклад піоціаніну (рис. 4.) [Plackett et al., 1946].

Рис. 4. PBD факторів впливаючих на синтез піоціаніну [Gaber et al., 2015]

Trial	pH	Incubation time	Temperature	Inoculum size	Peptone	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Alanine	Glycerol	Glucose	K ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	FeSO ₄ ·7H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	Pyocyanin concentration (μg/ml)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	1-	19.29
2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1-	12.55
3	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1+	26.97
4	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	1+	19.18
5	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	1+	9.05
6	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	1+	4.95
7	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	1+	20.03
8	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	1+	9.5
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	1+	6.2
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	1+	1.37
11	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	1-	0.85
12	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	1-	2.39
13	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	1-	5.12
14	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	1-	2.48
15	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	1-	1.93
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1-	0

В порівнянні методологія поверхні відгуку (RSM) — менш трудомісткий експериментальний статистичний спосіб, як правило, задовольняючий оптимізацію багатьох мікробних процесів. Цей метод є достатньо ефективним і широко розглядається як теоретичними, так і практичними дослідниками. RSM це скоріш сукупність статистичних методів для проектування експериментів, побудови моделей, оцінки впливу факторів і пошуку оптимальних умов факторів (незалежних змінних), на які впливають відповідні реакції. Запровадження RSM в оптимізацію значно скорочує витрати часу та покращує вихід продукції, що зменшує витрати. Зазвичай RSM часто застосовуються після того, як виявлено кілька життєво важливих факторів, які можна контролювати. [Abdel-Fattah et al., 2005].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оптимізація умов синтезу піоціаніну

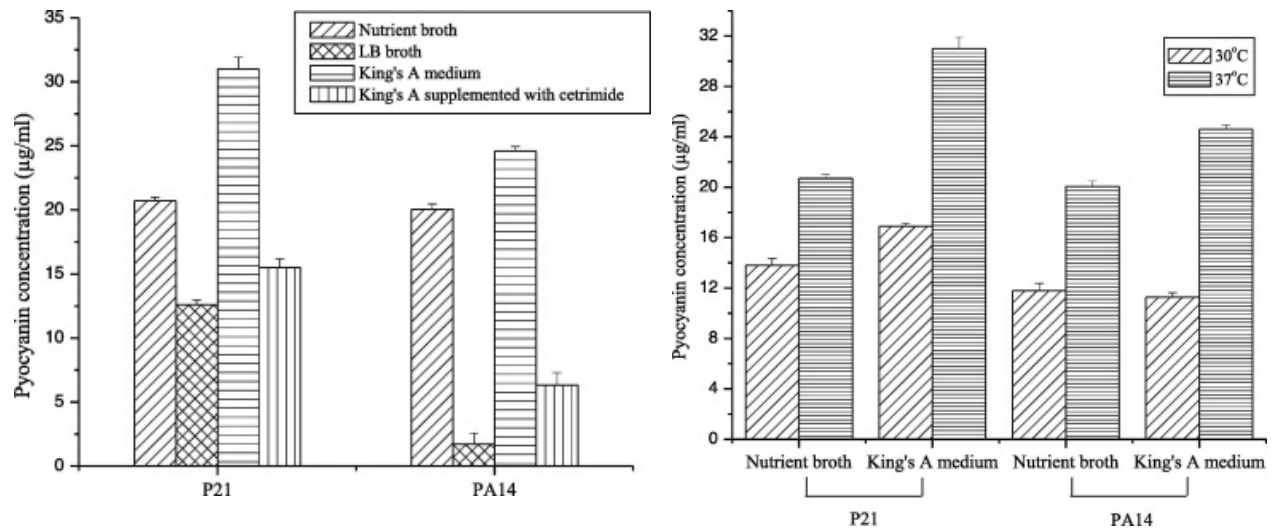
Загалом штамам *Pseudomonas aeruginosa* достатньо близько 5-7 днів до моменту незмінної в рості культури, що свідчить про кінець експоненційної - початок стаціонарної фази розвитку. Як було зазначено вище саме в цьому діапазоні відбувається синтез вторинних метаболітів, в тому числі і піоціаніну, щоб захиститися від конкуренції інших представників штамів. Варто зазначити, що інтенсивність синтезу вторинних метаболітів часто не пов'язана зі швидкістю накопичення біомаси штамів. Однак більшість проаналізованих оптимізаційних досліджень одностайно наполягають на прямій залежності виходу піоціаніну та інших метаболітів *Pseudomonas* від складу поживного середовища.

Середовища. Здебільшого для синтезу піоціаніну використовують такі поживні середовища: King's A, King's B, LB, Hiss's, MPB (збагачений 5% глюкозою) та інші (рис. 5.). Варто ще раз зазначити, що вибір середовища в першу чергу залежить від особливостей штамів.

На синтез піоціаніну в першу чергу впливають джерела вуглецю та азоту необхідні для росту. Більшість вчених за експериментальних та статистичних дослідів порівнюючи склад поживного середовища з інтенсивністю накопичення біомаси та виходом піоціаніну відзначають, що найбільша кількість клітин та пігменту майже для всіх досліджуваних штамів спостерігається у рідкому варіанті середовища King's A. Саме в ньому відбувається найбільш інтенсивна зміна кольору, що свідчить про накопичення метаболіту. Цей результат пояснюється вмістом в King's A важливих джерел вуглецю та азоту, а саме пептону (велика кількість амінокислот) та гліцерину. Хоча для деяких штамів оптимальними джерелом вуглеводів був манітол (штам DN9). Так само деякі органічні джерела азоту, такі як сечовина (13,4 мкг/мл) і екстракт яловичини (12,2 мкг/мл), а також неорганічні джерела азоту, такі як

хлорид амонію (12,9 мкг/мл) і сульфат амонію (11,79 мкг/мл), також показали схожу кількість піоціаніну при використанні окремо.

Рис. 5. Вплив поживних середовищ та температури на вихід піоціаніну одного штаму [Elbargisy et al., 2021]



Солі. Не без винятків більшість поживних речовин підтримує виробництво піоціаніну за низької концентрації фосфат-іонів і достатньої кількості сульфат- і хлорид-іонів. Так поживне середовище King's A містить $MgCl_2$ та K_2SO_4 , що пояснює його ефективність для продукування піоціаніну. Частина авторів повідомляють про те, що синтез цього пігменту контролюється концентрацією заліза. Інші дослідження показують підвищення виходу піоціаніну при наявності $NaCl$ і $FeSO_4$, що підтверджує попередні результати. Статистичний підхід для скринінгу Плакетта-Бермана (PBD) визначив, що значущими змінними для продукції піоціаніну є показники пептону, H_2PO_4 і хлоридів ($NaCl$, KCl та $MgCl_2$), а сульфатів та маніту - незначущими.

pH середовища. Статистичний аналіз PBD визнає водневий показник значущою змінною. Оптимізовані середовища для синтезу піоціаніну частіше за все обмежені діапазоном від 7 до 8, який є найбільш підходящим для росту *P. aeruginosa* [Sankaralingam et al., 2014].

Однак на практиці, з розгляду великої кількості спроб оптимізації, через несподівані кращі значення для деяких штамів, зустрічаються водневі

показники від 6,92 до 8,4. Більш того частина представників *Pseudomonas aeruginosa* байдужі в процесі зростання клітин як при рН 7, так і при рН 8. Результати часто не показують суттєвої різниці у виході піоціаніну в процесі культивування штамів в цьому діапазоні.

Температура. Загалом *Pseudomonas aeruginosa* характерна висока термостабільність. Ситуація схожа із водневим показником і оптимальне значення температури варіює в значному для культивування діапазоні близько 25°C-37°C. Проте оптимальними показником для більшості штамів є зростання при 35°C або скоріш 37°C. Ця температура більш дієва у виробництві піоціаніну, ніж зростання при 30°C. Висновок узгоджується з дослідниками, які перевірили широкий діапазон температур (від 25°C до 50°C), підтвердивши, що 37°C є оптимальною температурою для виробництва піоціаніну [Rani et al., 2018]. Ті самі результати були повідомлені раніше в 1958 році і пояснювалися зниженням швидкості росту при зниженій температурі та перетворенням попередньо сформованих пігментів у коричнево-синій до повного виробництва піоціанового пігменту.

Аерація. *Pseudomonas aeruginosa* — це аеробна бактерія, тобто для процесів життєдіяльності потребує кисень. Однак вона може бути і анаеробною в умовах відсутності кисню. Тоді вмикаються інші шляхи, наприклад нітратний.

В дослідженнях струшування інокульованих колб з показником від 200 до 223,7 об/хв спричиняло значне збільшення виходу піоціанінового пігменту порівняно зі статичним станом. Наприклад, одна з оптимізацій умов синтезу піоціаніну визначила, що сприятливими умовами виробництва для штамів P21, PA14 є інокуляція рідкого середовища King's A, попередньо відрегульована до рН 7, та інкубацією при 37°C зі струшуванням при 200 об/хв протягом трьох-чотирьох днів [Elbargisy et al., 2021].

Магнітне поле. Припускається, що висока магнітна індукція може призвести до більшої концентрації піоціаніну. Дослід з оцінки впливу обертового магнітного поля (RMF) та статичного магнітного поля (SMF) на

вироблення піоціаніну, швидкість росту та дихання *P. aeruginosa* показав, що обертове магнітне поле (50 Гц) стимулювало ріст клітин бактерії приблизно на 8%, тоді як статичне магнітне поле на 32% (дані у середньому). Тобто осередженість на швидшому зростанні культури означатиме використання SMF, а не RMF. Але варто згадати, що вихід піоціаніну й інших вторинних метаболітів не залежить від інтенсивності росту клітин *P. aeruginosa*, тому результати показують, що виробництво піоціаніну з цієї бактерії можна збільшити, застосовуючи саме RMF з частотою 50 Гц.

Час впливу електромагнітного поля також може відігравати роль у процесі виробництва піоціаніну за допомогою *P. aeruginosa*. До найвищої концентрації піоціаніну порівняно з контролем призводила магнітна підтримка протягом 6 годин. Це пояснюється тим, що по закінченню 6 годин культура досягає пізньої логарифмічної або ранньої стаціонарної фази розвитку.

Добавки. Неодноразово приріст виходу піоціаніну досягається додаванням у поживні середовища усіляких допоміжних компонентів. Іноді оптимізовані умови потребували додавання невеликої кількості глюкози або сахарози (1-5%). В експерименті з середовищем King's A більший вихід піоціаніну показало доповнення соєвими бобами, а потім доповнення бататом. Інший експеримент випробовував дорослу бичачу сироватку (ABS) та фетальну бичачу сироватку (FBS). В результаті завдяки наявності у зразках ABS інгібіторів, таких як білки комплементу та антитіла, використання FBS без антитіл було ефективним для збільшення виробництва піоціаніну у досліджуваних ізолятах. Є інформація, що високі концентрації оксиду цинку пригнічують продукування піоціаніну, тоді як незначні навпаки збільшують виробництво метаболіту [Jabłońska et al., 2022].

3.2. Оптимізація умов синтезу біосурфактантів

Склад і вихід рамноліпідів, як і в випадку з іншими вторинними метаболітами *P. aeruginosa* залежать від умов культивування і

штаму-продуцента. Узагальнюючи основну інформацію зазначають, що джерело вуглецю та азоту, кількість іонів, що використовуються в середовищі, рН, температура та перемішування, впливають на якість і кількість рамноліпідів.

Середовища. Рамноліпіди в основному виробляються під час стаціонарної фази життєвого циклу бактерій. Стаціонарна фаза індукується обмеженням концентрації одного з компонентів середовища, наприклад джерела вуглецю, азоту, фосфору або мікроелементів. В якості вуглецевих субстратів можна використовувати, такі водорозчинні сполуки як гліцерин, глюкозу, маніт та етанол. Однак неодноразово повідомляється, що неполярні органічні субстрати, такі як вуглеводні та рослинні олії, дають більший вихід продукту, що призводить до вищих кінцевих концентрацій рамноліпідів.

Для синтезу рамноліпідів з *P. aeruginosa* часто готують середовища LB (Лурі-Бертані), MSM (мінеральне сольове середовище) і останнім часом PPAS (фосфатно-обмежена протеоза пептон-амонійна сіль).

Значно посилену продукцію дослідники отримували на оптимізованому середовищі PPAS. Особливо доповнення соняшниковою олією (як джерело вуглецю) та хлориду амонію, пептону (як джерела азоту) значно покращили виробництво рамноліпідів. Порівняння продукції рамноліпідів *P. aeruginosa*, вирощеної в LB, широко використовуваному середовищі, та оптимізованому PPAS показало виробництво до 15 і 3000 мг л⁻¹, відповідно, чітко демонструючи потенціал оптимізації для посилення продукції рамноліпідів [Rikalovic et al., 2012].

Дослідження проводилось із штамом *P. aeruginosa san-ai*. Причини значного виходу в роботі з цим середовищем можна отримати ознайомившись із знайденими для синтезу рамноліпідів оптимальними компонентами та умовами.

Джерело азоту. Азот є важливим і значущим компонентом для росту мікроорганізмів а отже напевне, важливим фактором для виробництва біосурфактантів. Але дослідники, спостерігаючи за результатами

оптимізаційних робіт публікують інформацію про те, як збільшення виробництва біосурфактанту *P. aeruginosa* спричиняє саме обмеження азоту. Таким чином збільшення концентрації азоту спричиняє зменшення виробництва рамноліпідів, але зростання бактерій було посилюється, що призводить до збільшення кількості бактерій.

Більшість науковців пишуть про співвідношення C:N від 16:1 до 18:1 та наводять докази стимуляції нам максимального виходу рамноліпідів. Варто зазначити, що вплив співвідношення C:N на продукцію рамноліпідів залежить від штамів бактерій, тому що деякі спеціалісти повідомляють про інші оптимальні пропорції цих органоелементів, наприклад в літературі можна зустріти співвідношення C:N 60:1. Повідомляється також про зміну складу утвореного біосурфактанту в умовах обмеження азоту [Syldatk et al., 1985].

В якості джерела азоту для цього процесу використовують: пептон, сечовину, амонію сульфат, амонію нітрат, натрію нітрат, м'ясні екстракти, солодовий екстракти. У дискусіях про вибір оптимального джерела з досить ранніх досліджень зазначені саме нітрати. Новітні ресурси надають результати ефективності в порядку нітрат натрію > дріжджовий екстракт > сечовина [Onwosi et al., 2012]. І згідно більшості досліджень для виробництва рамноліпідів *P. aeruginosa* нітрат натрію був ефективніший за сульфат амонію та сечовину. Інші дані надають щодо специфічних штамів або навіть видів *Pseudomonas*.

Неорганічні джерела азоту ефективно підсилюють штами для виробництва сурфактину, ніж джерела органічного азоту. Крім того, було помічено, що серед джерел неорганічного азоту NH_4NO_3 та NaNO_3 дали високий вихід концентрації сурфактину порівняно з іншими джерелами неорганічного азоту. Було продемонстровано, що солі амонію та сечовини серед неорганічних солей азоту є переважними для виробництва біосурфактантів у *Arthrobacter* sp., тоді як нітрати підтримують максимальне вироблення сурфактину в *P. aeruginosa*. Концентрації нітрату амонію нижче або вище 4,6 г/л призводили до низького

рівня концентрації сурфактину в усіх досліджуваних штаммах [Haytham et al., 2005].

Джерело вуглецю. Багато мікроорганізмів синтезують біосурфактанти, використовуючи широкий спектр джерел вуглецю (вуглеводи, вуглеводні та рослинні олії). Повідомляється, що сира нафта, глюкоза, сахароза та гліцерин є хорошими джерелами вуглецю для виробництва біосурфактантів. Для виробництва рамноліпідів *Pseudomonas* spp. водорозчинні джерела вуглецю, такі як гліцерин, глюкоза, маніт і етанол, рекомендують частіше за все. п-гексадекан, парафінове масло, масло бабассу показують не такі добрі результати в порівнянні з гліцерином. Гліцерин можна отримувати з відновлюваних субстратів, у тому числі гідролізом тригліцеридів з тваринних жирів і рослинних олій різної чистоти, або отримувати нафто хімічними процесами. На жаль, для торгового використання ціни гліцерину відносно високі.

В дослідженнях за допомогою статистичної методології RSM меляса (джерело вуглецю) і дріжджовий екстракт (джерело азоту) показали значну взаємодію вироблення рамноліпідів. Виявлено, що меляса є впливовою поживною речовиною порівняно з екстрактом дріжджів, в разі коли обидві поживні речовини поступово збільшуються в середовищі. Вплив на вироблення рамноліпідів був більшим у випадку меляси порівняно з екстрактом дріжджів. Той же ефект у випадку меляси спостерігався при дослідженні хлориду натрію. Що знов підтверджує, що роль джерела вуглецю відіграє дуже важливу роль у виробництві рамноліпідів.

Дослідники активно продовжують пошуки дешевшого субстрату для синтезу рамноліпідів аби вивести виробництво цього біосурфактанту на вищій рівень. Використання в культиваціях промислових відходів може здешевити виробництво і зменшить їх забруднюючий вплив на екологію. Кілька досліджень в якості джерела вуглецю використовували соєвий та риб'ячий жир або рибне борошно, які додавались у середовище. Висновки надають перевагу

соевому жиру з більшим виходом рамноліпиду. Є інформація про використання в якості субстратів різноманітних рослинних, фруктових відходів. Хтось помітив посилений синтез із використання апельсинових кірок. Зараз активно ведуться дослідження для отримання оптимальних середовищ за допомогою різноманітних відпрацьованих олій для смаження з фритюрниць, стоків і т.д.

Стосовно біосурфактанту *B. subtilis*: досліді з оптимізації виробництва сурфактину продемонстрували, що різні джерела вуглецю в середовищі впливають на склад утворення бісурфактанту. Коли поживне середовище доповнювали різними вуглеводами як єдиними джерелами вуглецю, спостерігалось значне збільшення виходу сурфактину у *B. subtilis* (BBk1) AB01335-1 та AB02238-1 порівняно з іншими використаними джерелами вуглецю. Це вказує на те, що глюкоза, сахароза та маноза посилюють вихід сурфактину. Додавання вуглеводів або рослинних олій до середовища виробництва призводило до низького рівня виробництва сурфактину порівняно з вуглеводами, особливо глюкозою. *B. subtilis* потребує лише вуглеводів для виробництва біосурфактантів, а саме, ліпопептидів, як і інші *Bacillus* sp. Оскільки виробниче середовище було оптимізовано з використанням глюкози як єдиного джерела вуглецю, різні концентрації глюкози досліджували на найкращий вихід сурфактину з досліджуваних штамів. До виробничого середовища додавали глюкозу в концентраціях 5; 10; 20; 30; 40; 50 і 60 г/л, отримані результати з'ясували, що спостерігалось значне збільшення виробництва сурфактину при додаванні глюкози до 30 г/л, хоча спостерігалось лінійне збільшення концентрації сурфактину зі збільшенням початкової глюкози [Haytham et al., 2005].

Солі.

Найбільший вплив на виробництво рамноліпідів мають солі K_2HPO_4 та MgSO_4 (рис. 6.). Також в оптимізованому складі середовища можуть зустрічатися NaCl , CaCl_2 та NaNO_3 .

За допомогою статистичному методу RSM було виявлено, що KH_2PO_4 є найважливішим фактором, який відповідає за вироблення рамноліпідів у присутності інших поживних речовин. Значущою також була його взаємодія із джерелом вуглецю, наприклад мелясою, та з іншими солями, особливо MgSO_4 .

Оптимальними концентраціями цих компонентів середовища названі дані: калію дигідрофосфат 1,731 г/л, магнію сульфат 1,001 г/л і натрію хлорид 5,214 г/л. Але дані стосуються штаму *Pseudomonas aeruginosa* RT, тому оптимуми для будь-яких інших штамів напевне відрізнятимуться [Turbekar et al., 2015].

Рис. 6. Вплив (а) меляси та KH_2PO_4 , (b) екстракту дріжджів і KH_2PO_4 , (c) MgSO_4 і KH_2PO_4 , (d) Натрію Хлорид і KH_2PO_4 на виробництво рамноліпідів [Turbekar et al., 2015].

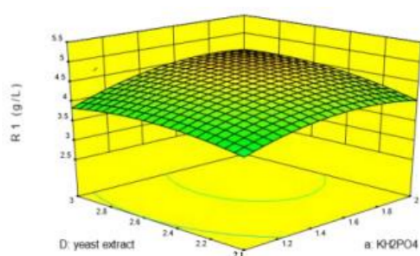


Figure 1(a)

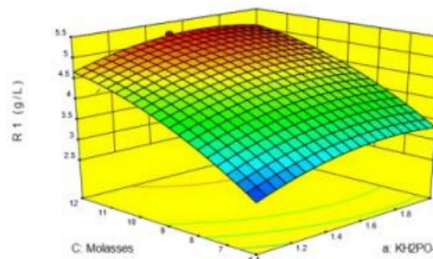


Figure 1(b)

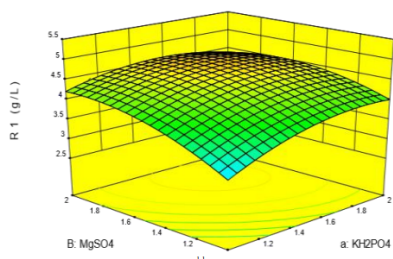


Figure 1(c)

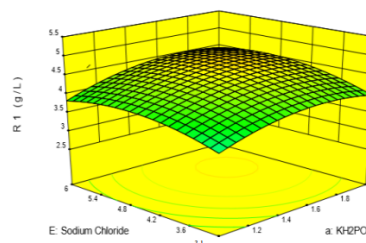


Figure 1(d)

Помічено, що збільшення концентрації сурфактину спостерігалось зі збільшенням концентрації FeSO_4 у поживному середовищі. Це можна пояснити з огляду на те, що залізо є загальним кофактором мікробних ферментів і білків, тому воно є важливою мінеральною живильною речовиною для мікроорганізмів, які розробили різноманітні стратегії для отримання заліза, одночасно захищаючи їх від потенційної токсичності заліза. Додавання MnSO_4 збільшує продукцію сурфактину, а найвища концентрація біосурфактанту була

досягнута при концентрації 50 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Було помічено, що найвища концентрація біосурфактанту досягається при концентрації 50 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в *B. subtilis* [Haytham et al., 2005].

рН середовища. Перевіливши широкий спектр водневих показників для максимального виходу рамноліпідів, науковці наголошували на інтервалі від 6 до 6,5. Вони ж відмічали, що продукування різко знижувалося за рН вище 7,0 [Guerra-Santos et al., 1984].

Пізніші публікації називають рН 7,0 нейтральним значенням, що має здатність підвищити вихід рамноліпиду порівняно з виробництвом у слабокислих умовах (рН 6,25) [Mata-Sandoval et al., 2001].

Нові погляди на культивування, а, можливо, і кардинальна різниця між штамами дають інші результати. Повідомляється, що для максимального накопичення продукту оптимальним рН середовища є значення 8,2-8,4, що досягається без коригування рН під час ферментації. І що за водневих показників 6,0 та 9,0 накопичення метаболіту знижувалося, ніж за значення 7,0. Описано, що при встановлені рН 7,0 спостерігається найбільше накопичення біомаси, але зниження виходу рамноліпиду.

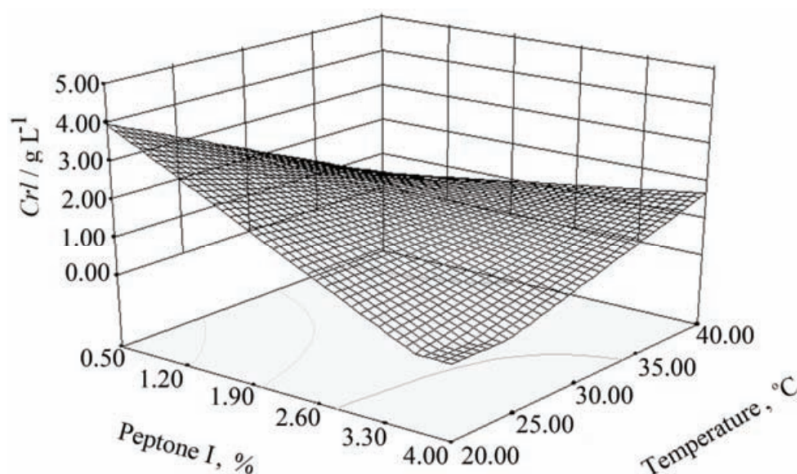
У випадку сурфактину, низький вихід спостерігався коли поживне середовище коригували на значення рН нижче або вище 6,5, а максимальний вихід концентрації сурфактину досягався при рН 6,5-7 [Haytham et al., 2005].

Температура.

Узагальнюючим оптимальним діапазоном температур для рамноліпідного синтезу є діапазон від 30 до 42°C. Знов широкий діапазон виправданий великою різноманітністю штамів (рис. 7.). Звужений для більшості штамів був діапазон 30-37°C [Sahoo et al., 2011]. Переважна кількість дослідників на підставі власних досліджень називають оптимальним значенням температуру 37°C [Chen et al., 2007].

Концентрація біосуфактанта сурфактину досягала свого максимуму за температурі 30°C [Haytham et al., 2005].

Рис. 7. Вплив температури та концентрації джерела азоту, з 3,5% концентрації джерела вуглецю, на виробництво рамноліпідів *P. aeruginosa* san-ai [Rikalovic et al., 2012].



Інші джерела повідомляють про ефективність застосування двостадійного температурного режиму для більшого синтезу біосурфактанта: перші 36 годин встановлювали температуру 34°C, потім (протягом 4 год) – поступове зниження температури до 30°C.

Аерація. Дослідники неодноразово помічають як об'єм заповнення і швидкість перемішування мають певний вплив на вироблення рамноліпиду. Вихід біосурфактанту різко знижується при великих обсягах біомаси, що підтверджує висновки необхідності штамам *Pseudomonas aeruginosa* кисню. Для більшості штамів оптимальною швидкістю перемішування для максимального виробництва рамноліпиду є значення 200 до 335 об/хв, оскільки продукція метаболіту поступово зменшувалася при більш високих чи низьких швидкостях перемішування, що можна пояснити сильним піноутворенням, викликаним емульгуванням рамноліпиду.

Збільшення швидкості перемішування до 150 об/хв призводить до збільшення виробництва сурфактину, але не більше. Це може бути пов'язано з впливом зсуву на досліджуваний *Bacillus* sp. вище 150 об/хв [Haytham et al., 2005].

ВИСНОВКИ

Склад і вихід пігментів та біосурфактантів, як і в випадку з іншими вторинними метаболітами *P. aeruginosa* та *B. subtilis*, безпосередньо залежать від умов культивування і штаму-продуцента.

Вид *P. aeruginosa* має величезну та різноманітну кількість штамів. Цей факт виявився великою перешкодою оптимізувати умови культивації, компоненти середовища та їхні концентрації для загалом усього виду, через великий розбіг властивостей штамів. З цієї причини в основному в роботі були вказані діапазони, що включають оптимальні значення для більшості штамів *P. aeruginosa*, з якими проводили оптимізацію дослідники джерел літератури.

1. Для синтезу вторинних метаболітів *P. aeruginosa* та *B. subtilis* величезний вплив мають джерела вуглецю, азоту, іонів у поживному середовищі. Найбільш оптимальними середовищами для отримання піоціаніну є King's A, а для рамноліпідів — PPAS. Кращим джерелом азоту для біосурфактантів виступають нітрати.

2. Найбільший вплив на виробництво рамноліпідів мають солі K_2HPO_4 , MgSO_4 , хлориди та нітрати. На синтез сурфактину MnSO_4 і FeSO_4 . Виробництво піоціаніну має вищий вихід за низькій концентрації фосфатів, достатньої кількості сульфатів та хлоридів, і в разі додавання невеликої кількості глюкози або сахарози.

3. Для більшості штамів оптимальною швидкістю перемішування для максимального виробництва рамноліпиду є значення 200 до 335 об/хв (200 для сурфактину), діапазон від 200 до 223,7 об/хв спричиняв значне збільшення виходу піоціанінового пігменту. Узагальнюючим оптимальним діапазоном температур для синтезу біосурфактантів є значення від 30 до 42°C (30 °C для сурфактину), для піоціаніну — від 25°C до 37°C. Водневий показник в залежності від штаму pH 6,9-8,4.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрюков Б.Г. Бактериоциногенный потенциал морских микроорганизмов. / Б.Г. Андрюков, В.В. Михайлов, Н.Н. Беседнова // Журнал морской биологии. — 2018. — С. 433–441.
2. Громов Б.В. Экология бактерий / Б.В. Громов, Г.В. Павленко // Л.: ЛГУ. — 1989. — С. 248.
3. Abdel-Fattah Y.R. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs / Y.R. Abdel-Fattah, H.M. Saeed, Y.M. Gohar, M.A. // Process Biochem. — 2005. — Vol. 40 — P. 1707–1714.
4. Arancibia F. Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis / F. Arancibia // Arch. Intern. Med. — 2002. — Vol. 162. — P. 1849–1858.
5. Baharum S.N. Marine microorganisms: potential application and challenges. / S.N. Baharum, E.K. Beng, M.A.A. Mokhtar, // J. Biolog. Sci. — 2010. — Vol. 10. — P. 555–564.
6. Baral B. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. / B. Baral, A. Akhgari, M. Metsä-Ketelä // Synthetic and Systems Biotechnology. — 2018. — Vol. 3(3) — P. 163–178.
7. Cabrera-Valladares N. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. / N. Cabrera-Valladares, A.P. Richardson, C. Olvera, L.G. Treviño // Appl. Microbiol. Biotechnol — 2006. — Vol. 73 (1). — P. 187–94.
8. Chen S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2 / S. Chen, Y. Wei, J. Chang // Appl. Microbiol. Biotechnol — 2007. — Vol. 76(1) — P. 67–74.
9. Das S. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. / S. Das, L. Ward, R. Burke // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — Vol. 81. — P. 419–429.

10. Davey M.E. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / M.E. Davey, N.C. Caiazza // J. Bacteriol. — 2003. — Vol. 185 (3). — P. 1027–36.
11. Diggle S. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat / S. Diggle, M. Whiteley. — 2020. — Vol. 166 (1). — P. 30–33.
12. Elbargisy M. Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Elbargisy // Saudi Journal of Biological Sciences. — 2021. — Vol. 28. — P. 993-1000.
13. Gaber A.A. Optimization of pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* JY21 using statistical experimental designs. / A.A. Gaber // International Journal of ChemTech Research. — 2015. — Vol. 8. — P. 137-148.
14. Giddens S. Influence of antibiotic production and preventive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in planta. / S. Giddens, G. Houlston, H. Mahanty // Environ Microbiol. — 2003. — Vol. 5 (10). — P. 1016-1021.
15. Gokulan K. Metabolic pathways. Production of Secondary Metabolites of Bacteria / K. Gokulan, S. Khare, C. Cerniglia // Encyclopedia of Food Microbiology. — 2014. — P. 561–569.
16. Glick R. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Glick, C. Gilmour, J. Tremblay, S. Satanower, O. Avidan, E. Déziel, E.P. Greenberg // J. Bacteriol. — 2010. — Vol. 192 (12). — P. 2973–80.
17. Guerra-Santos L.H. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source / L.H. Guerra-Santos, O.R. Kappeli, A. Fiechter // Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — Vol. 48 (2). — P. 301–305.
18. Hari N. Endogenous nitric oxide protects bacteria from a wide range of antibiotics. / N. Hari, N. Moorthy, C. Karthikeyan, P. Trivedi // J. Science — 2009. — Vol. 325(5946). — P. 1380–1384.

19. Hassan H. Mechanism of the antibiotic action pyocyanin. / H. Hassan, I. Fridovich // *Journal of Bacteriology*. — 1980. — Vol. 141 (1). — P. 156–163.
20. Haytham M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production / M. M. Haytham, A. S. Bashandy, N. H. Aziz // *International Journal of Agriculture and Biology*. — 2005. — Vol. 7(3). — P. 337–344.
21. Irfan-Maqsood M. Rhamnolipids: Well-Characterized Glycolipids with Potential Broad Applicability as Biosurfactants / M. Irfan-Maqsood, M. Seddiq-Shams // *Industrial Biotechnology*. — 2014. — Vol. 10 (4). — P. 285–291.
22. Jabłońska J. The influence of nanomaterials on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* / J. Jabłońska, K. Dubrowska, A. Augustyniak, R. Wróbel, M. Piz, K. Cendrowski, R. Rakoczy // *Applied Nanoscience* — 2022. — Vol. 12. — P. 1929–1940.
23. Jogaiah S. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. / S. Jogaiah // *Scientific Reports* — 2016. — Vol. 6. — P. 30789.
24. Kerr J.R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. / J.R. Kerr // *Journal of Clinical Pathology* — 1999. — Vol. 52. — P. 385–387.
25. Krieg N.R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / N.R. Krieg // Springer-Verlag: New York, USA. — 2010. — Vol. 2.
26. Linhardt R.J. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose / R.J. Linhardt, R. Bakhit, L. Daniels, F. Mayerl, W. Pickenhagen // *Journal Biotechnol. Bioeng.* — 1989. — Vol. 33 (3). — P. 365–8.
27. Mata-Sandoval J.C. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2 / J.C. Mata-Sandoval, J. Karns, A. Torrents // *Microbiol. Res.* — 2001. — Vol. 55. — P. 249–256.

28. Mercado B.J. Interaction between plants and beneficial *Pseudomonas* sp .: use of beneficial traits for plant protection. / B.J. Mercado, P.A. Bakker // Antoni Van Leeuwenhoek. — 2007. — Vol. 92(4) — P. 367–389.
29. Mondol M. Diversity of Secondary Metabolites from Marine Bacillus Species: Chemistry and Biological Activity. / M. Mondol, H. Shin, M. Islam // Marine Drugs. — 2013. — Vol. 11(8) — P. 2846–2872.
30. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants / C.N. Mulligan // Environ. Pollut. — 2005. — Vol. 133 (2) — P. 183–98.
31. Nakaike S. Cell killing activity and kinetic analysis of a new antitumor compound NC-190, a benzo [α] phenazine derivative / S. Nakaike, T. Yamagishi, K. Nanaumi, S. Otomo, S. Tsukagoshi // Jpn J Cancer Res — 2005. — Vol. 83 (4) — P. 402–409.
32. Niu G.Q. Biosynthesis and regulation of secondary metabolites in microorganisms / G.Q. Niu, H.R. Tan // Life Sciences. — 2013. — Vol. 56 (7). — P. 581–583.
33. Onwosi C.O. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil / C.O. Onwosi, F.J.C. Odibo // World J Microbiol Biotechnol. — 2012. — Vol. 28. — P. 937–942.
34. Pinu F.R. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. Metabolites / F.R. Pinu, S.G. Villas-Boas, R. Aggio — 2017. — P. 7, 53.
35. Plackett R.L. The design of optimum multifactorial experiments. / R.L. Plackett, J.P. Burman. // Biometrika — 1946. — Vol. 33. — P. 305–325.
36. Rao M. P. N. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. / M. P. N. Rao, M. Xiao // Front Microbiol. — 2017. — Vol. 8. — P. 1113.

37. Rani S. Production and antimicrobial, antioxidant and anticancer applications of pyocyanin from isolated *Pseudomonas aeruginosa* / S. Rani, A. Rani, S. Chauhan, W. Azmi // *SciFed J. Ferment. Microbial Technol.* — 2018. — Vol. 1.
38. Rikalovic M.G. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai / G. Gojgic-Cvijovic, M.M. Vrvici, V. Karadzicj // *Serb. Chem. Soc.* — 2012. — Vol. 77 (1). — P. 27–42.
39. Ruocco N. Marine Sponges and Bacteria as Challenging Sources of Enzyme Inhibitors for Pharmacological Applications. / N. Ruocco, S. Costantini, F. Palumbo, M. Costantini // *Mar Drugs.* — 2017. — Vol. 15(6). — P. 173.
40. Saha S. Phenazine Pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and Their Application as Antibacterial Agent and Food Colorants. / S. Saha, R. Thavasi, S. Jayalakshmi // *Research Journal of microbiology.* — 2008 — Vol. 3. — P. 122–128.
41. Sahoo S. Optimization of culture condition for biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. / S. Sahoo, S. Datta, D. Biswas // *JASR.* — 2011. — Vol. 2(3). — P. 32–36.
42. Sankara Lingam S. Screening and growth characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* / S. Sankara Lingam, S. Eswaran, B. Boomi, V.M. Sundaram, T. Shankar // *Adv. Environ. Biol.* — 2014. — Vol. 8. — P. 673–680.
43. Satpute S.K. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers. / S.K. Satpute, A.G. Banpurkar, P.K. Dhakephalkar, I.M. Banat, B.A. Chopade // *Crit. Rev. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 30. — P. 127–144.
44. Schoonbeek H. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natura environments / H. Schoonbeek, J. Raaijmakers, M. De Waard // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2012. — Vol. 15. — P. 1165–1172.
45. Siddharth S. Evaluation of antimicrobial, enzyme inhibitory, antioxidant and cytotoxic activities of partially purified volatile metabolites of marine *Streptomyces* sp. S2A. / S. Siddharth, R.R. Vittal // *Microorganisms.* — 2018. — Vol. 6. — P. 72.

46. Singh M. Nonribosomal peptide synthetases: Identifying the cryptic gene clusters and decoding the natural product / M. Singh, S. Chaudhary, D. Sareen // *J Biosci.* — 2017. — Vol. 42(1). — P. 175–18.
47. Sylđatk C. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting *Pseudomonas* cells / C. Sylđatk, S. Lang, U. Matulovic, F. Wagner // *Z Naturforsch C.* — 1985. — Vol. 40(1-2). — P. 61.
48. Tiso T. Rhamnolipids: production, performance, and application. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*. Lee, S.Y. (ed). / T. Tiso, M. Muller, L. Tsvetanova, L. Carraresi, S. Broring // Cham, Switzerland: Springer International Publishing — 2017. — P. 1–37.
49. Turbekar R. Optimization Studies for Enhancing Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* RT Using Response Surface Methodology / R. Turbekar, N. Malik, D. Thakare // *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* — 2015. — Vol. 3 (5). — P. 65–73.
50. Wang Y. P. Metabolite sensing and signaling in cell metabolism. / Y. P. Wang, Q.Y. Lei // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* — 2018. — Vol. 3.
51. Wang Q.H. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery / Q.H. Wang, X.D. Fang, B.J. Bai, X.L. Liang, P.J. Shuler, W.A. Goddard, Y.C. Tang // *Biotech. Bioeng.* — 2007. — V. 98. — P. 842–853.
52. Yuan X. Adsorption of surfactants on a *Pseudomonas aeruginosa* strain and the effect on cell surface lyphophilic property / X. Yuan, F. Ren, G. Zeng, H. Zhong, H. Fu, J. Liu, X. Xu // *Appl. Microbiol. Biotechnol* — 2007. — Vol. 76 (5). — P. 1189–98.
53. Yin J. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. / J. Yin, Q. Wu, G.Q. Chen // *Biotechnol Adv* — 2015. — Vol. 33. — P. 1433–1442.