

THE SYNTHESIS OF SURFACTANTS DURING *NOCARDIA VACCINII* K-8 CULTIVATION ON MIXED SUBSTRATES

N. Kudrya

National University of Food Technologies

Key words:

Surfactants
Intensification of biosynthesis
Bacteria of the *Nocardia*
genus
Energetically unequal growth
substrates

Article history:

Received 01.12.2012
Received in revised form
01.02.2013
Accepted 5.03.2013

Corresponding author:

E-mail:

npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The possibility to intensify the synthesis of metabolites with surface-active and emulsifying properties during *Nocardia vaccinii* K-8 cultivation on a mixture of carbohydrate and noncarbohydrate substrates was stated. It was shown that in case of the strain growth on mixed substrates, the conditional concentration of surfactants was in 2 times higher comparing with the cultivation on monosubstrates. It was found that the nature of the carbon source in the medium for inoculum significantly effected on the rates of surfactants synthesis (the conventional surfactant concentration and the emulsification index).

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII* K-8 НА ЗМІШАНИХ СУБСТРАТАХ

Н.В. Кудря

Національний університет харчових технологій

*Встановлено можливість інтенсифікації синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на суміші вуглеводних і неуглеводних субстратів. Показано, що у разі росту даного штаму на змішаних субстратах умовна концентрація поверхнево-активних речовин ПАР була більш як у 2 рази вищою порівняно з використанням відповідних моносубстратів. Встановлено, що природа джерела карбону у середовищі для одержання посівного матеріалу значно впливає на показники синтезу ПАР (умовна концентрація ПАР та індекс емульгування).*

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, бактерії роду *Nocardia*, енергетично нерівноцінні ростові субстрати.*

Виробництво поверхнево-активних речовин (ПАР) мікробного походження є досить перспективним напрямком у промисловості. Такі сполуки мають ряд переваг перед синтетичними аналогами, зокрема низька токсичність, стабільність властивостей у широкому діапазоні рН і температури, біодеградабельність, що виключає забруднення навколишнього середовища [6, 7]. Завдяки таким властивостям ПАР можуть використовуватися у харчовій промисловості (для надання певних структурних та смакових особливостей продукту), у фармацевтичній промисловості (для створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів), у нафтопереробній промисловості (для підвищення нафтовидобутку) і навіть у процесах біоремедіації екосистем [8].

Хоча ПАР мікробного походження і мають великі переваги перед синтетичними аналогами, але промислове виробництво в Україні дотепер не налагоджено через великі витрати на біосинтез, виділення і очищення цільового продукту, а також через низьку концентрацію синтезованих ПАР [5].

У зв'язку з цим потенційним шляхом підвищення ефективності технологій ПАР мікробного походження є використання дешевих ростових субстратів, наприклад, відходів виробництв [5]. Одним із таких субстратів є гліцерин, оскільки він утворюється у великих кількостях при виробництві біодизелю [9]. У попередніх дослідженнях була встановлена можливість використання гліцерину, як субстрату, для *Nocardia vaccinii* К-8 та її здатність до синтезу речовин з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями [3, 4].

Одним із перспективних підходів до інтенсифікації біосинтезу є використання суміші ростових і неростових субстратів. В літературі зазначено, що комбінація енергетично нерівноцінних субстратів дає змогу уникнути непродуктивних втрат вуглецю та енергії, що мають місце у разі використання мікроорганізмами монособстрату, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у практично цінні вторинні метаболіти [1, 5]. Раніше [10] було встановлено, що за використання суміші сахарози (125 г/л) та олеїнової кислоти (166 г/л) замість стандартних середовищ з глюкозою, у разі культивування *Candida bombicola* ATCC 22214, синтез софороліпиду дріжджами підвищувався у 3 рази.

У праці [1] зазначено, що за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів показники синтезу ПАР підвищуються у 1,2–4 рази порівняно з культивуванням бактерій на монособстратах.

Метою даної роботи є дослідження синтезу поверхнево-активних речовин у разі культивування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на суміші ростових субстратів (гексадекан і глюкоза, етанол і глюкоза, гексадекан і гліцерин, глюкоза і гліцерин).

У попередніх дослідженнях [4], із забрудненого нафтою зразка ґрунту, було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і встановлено його здатність до синтезу ПАР.

Культивування штаму К-8 здійснювали на мінеральному поживному 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. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 г/л. Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин, етанол, гексадекан, глюкозу, а також суміш цих субстратів. Концентрація кожного з монособстратів у змішаному субстраті становила 0,5 і 1,0 % (об'ємна частка у разі використання етанолу, гексадекану і гліцерину, масова — при використанні глюкози). Використовувані моно- та змішані субстрати були еквімолярні за вуглецем.

Як посівний матеріал використовували культуру *N. vaccinii* К-8 з експоненційної фази росту, вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами вуглецю у середовищі для одержання інокуляту були монособстрати у концентрації 0,5 %, а також суміш субстратів (по 0,25 % кожного з монособстратів). Концентрація посівного матеріалу (10^4 – 10^5 клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) упродовж 168 год при 30 °С.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

– поверхневий натяг (σ_s) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина);

– для експрес-оцінки вмісту ПАР в культуральній рідині використовували показник, названий «умовна концентрація ПАР». Цей показник визначали як ступінь розведення культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР, що визначається описаним методом, виражається в безрозмірних одиницях і надалі буде позначатися як ПАР*;

– індекс емульгування (E_{24} , %) нативної культуральної рідини. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Перший етап був присвячений дослідженню можливості підвищення синтезу ПАР за умов росту *N. vaccini* К-8 на суміші етанолу та глюкози (табл. 1).

Встановлено, що максимальний показник ПАР* (4,0 – 4,4) та індекс емульгування (65 %) спостерігалися у разі використання інокуляту вирощеному на змішаних субстратах, незалежно від концентрації монособстратів у суміші. При цьому умовна концентрація ПАР була у 2 рази, а показник E₂₄ у 1,2 – 1,3 рази вищі порівняно з показниками на відповідних монособстратах.

Таблиця 1. Синтез ПАР *N. vaccini* К-8 на суміші етанолу та глюкози

Концентрація джерела вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Концентрація джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, %	Показники синтезу ПАР	
		ПАР*	E ₂₄ , %
Етанол, 0,5 + Глюкоза, 0,5	Етанол, 0,5	1,25 ± 0,06	54 ± 2,7
	Глюкоза, 0,5	1,7 ± 0,09	50 ± 2,5
	Етанол, 0,25 + Глюкоза 0,25	4,4 ± 0,22	65 ± 3,3
Етанол, 0,98	Етанол 0,5	2,0 ± 0,1	56 ± 2,8
Глюкоза, 1,22	Глюкоза 0,5	1,85 ± 0,09	56 ± 2,8
Етанол, 1,0 + Глюкоза, 1,0	Етанол, 0,5	0,7 ± 0,04	52 ± 2,6
	Глюкоза, 0,5	2,5 ± 0,13	52 ± 2,6
	Етанол, 0,25 + Глюкоза 0,25	4,0 ± 0,2	65 ± 3,3
Етанол, 1,96	Етанол 0,5	1,8 ± 0,09	43 ± 2,2
Глюкоза, 2,44	Глюкоза 0,5	1,7 ± 0,09	51 ± 2,6

П р и м і т к а. Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглецем. Концентрація глюкози наведена у % (масова частка), етанолу у % (об'ємна частка).

На наступному етапі досліджували показники синтезу ПАР штамом К-8 на суміші гексадекану і гліцерину (табл. 2).

З даних, наведених у табл. 2 видно, що умовна концентрація ПАР і індекс емульгування за умов росту штаму К-8 на суміші гексадекану та гліцерину підвищувалися на 11 – 167 %, порівняно з відповідними монособстратами. Раніше було встановлено, що за умов культивування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на такому самому змішаному субстраті показники синтезу ПАР зростали на 18 – 322 % [1].

Таблиця 2. Показники синтезу ПАР за умов росту *N. vaccini* К-8 на суміші гексадекану (1,0 %) і гліцерину (1,0 %)

Джерело вуглецю в середовищі для отримання інокуляту	ПАР*, % від контролю		E ₂₄ , % від контролю	
	Гексадекан	Гліцерин	Гексадекан	Гліцерин
Гексадекан + Гліцерин	267 ± 13,3	209 ± 10,4	102 ± 5,1	98 ± 4,9
Гексадекан	161 ± 8,1	126 ± 6,3	95 ± 4,7	91 ± 4,6
Гліцерин	256 ± 12,8	200 ± 10	100 ± 5	96 ± 4,8

П р и м і т к а. Контроль (100 %) — показники синтезу на відповідних монособстратах, в яких концентрація вуглецю еквімолярна концентрації змішаного субстрату.

На третьому етапі досліджували особливості синтезу ПАР штамом К-8 на суміші гліцерину і глюкози (рисунок).

Як видно з даних наведених на рисунку показник умовної концентрації ПАР за використання суміші гліцерину та глюкози підвищувався на 21 – 253 % порівняно з вирощуванням штаму К-8 на монособстратах. Максимальне підвищення ПАР* спосте-

рігали у разі використання посівного матеріалу, вирощеного на відповідній суміші, при цьому індекс емульгування майже не змінювався. При підвищенні концентрації моно-субстратів у суміші до 1 % спостерігалися схожі закономірності.

На наступному етапі досліджували показники синтезу ПАР на суміші гексадекану і глюкози.

На відміну від використання вищезгаданих сумішей, у разі культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з гексадеканом і глюкозою підвищення синтезу ПАР спостерігали тільки щодо моносубстрату гексадекану, а показник умовної концентрації ПАР майже не відрізнявся від його значення на моносубстраті глюкозі (табл. 3).

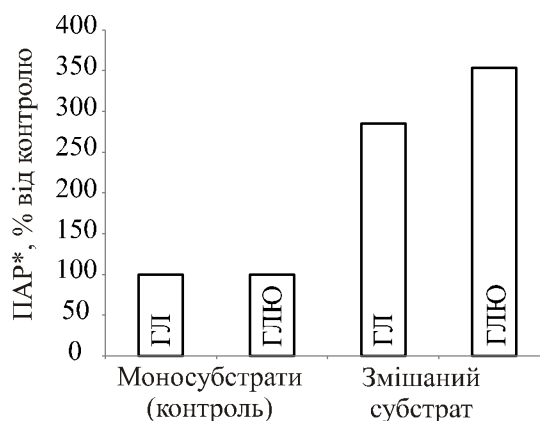
Таблиця 3. Синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* К-8 на суміші гексадекану та глюкози

Концентрація джерела вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Концентрація джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, %	Показники синтезу ПАР	
		ПАР*	E ₂₄ , %
Гексадекан, 0,5 + + Глюкоза, 0,5	Гексадекан, 0,5	2,5 ± 0,13	50 ± 2,5
	Глюкоза, 0,5	1,5 ± 0,08	53 ± 2,7
	Гексадекан, 0,25 + Глюкоза 0,25	2,8 ± 0,14	54 ± 2,7
Гексадекан, 0,89 Глюкоза, 1,14	Гексадекан 0,5	0,5 ± 0,03	54 ± 2,7
	Глюкоза 0,5	2,6 ± 0,23	48 ± 2,4

П р и м і т к а. Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглецем. Концентрація глюкози наведена у % (масова частка), гексадекану у % (об'ємна частка).

Варто відзначити, що у разі культивування *N. vaccinii* К-8 на суміші гексадекану та глюкози, оптимальним джерелом карбону у середовищі для одержання інокуляту виявився відповідний змішаний субстрат. Раніше [1] було встановлено, що за умов вирощування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші гексадекану і глюкози найвищі значення ПАР* також спостерігали за використання інокуляту, отриманого на відповідному змішаному субстраті. Подальші дослідження показали, що такі самі закономірності спостерігалися і при підвищенні концентрації глюкози і гексадекану у суміші до 1,0 %.

Недостатньо високі показники синтезу ПАР на суміші глюкози і гексадекану можуть бути зумовлені неоптимальним молярним співвідношенням концентрацій моносубстратів у суміші. Вивченню цього питання буде присвячена подальша робота. Аналогічні дослідження, присвячені даній проблемі, були проведені за умов культивування *A. Calcoaceticus* ІМВ В-7241 на суміші гексадекану і гліцерину [2]. На основі теоретичних розрахунків потреб для синтезу ПАР та біомаси штамом ІМВ В-7241 на енергетично дефіцитному субстраті гліцерині та енергетично надлишковому гексадекані, встановлено їх оптимальне молярне співвідношення (1:7). Завдяки цьому вдалося підвищити кількість синтезованих поверхнево-активних речовин у 2,6 – 3,5 рази, порівняно з показниками на моносубстратах.



Умовна концентрація ПАР за умов росту *N. vaccinii* К-8 на суміші гліцерину (0,5 %) та глюкози (0,5 %).

Контроль (100 %) — показники синтезу на моносубстраті гліцерині (ГЛ) і глюкозі (ГЛЮ). Інокулят вирощений на середовищі з гліцерином і глюкозою

Висновок

У результаті проведеної роботи встановлено, що показники синтезу ПАР у процесі культивування *N. vaccinii* К-8 на змішаних субстратах (етанол та глюкоза, гліцерин та глюкоза, гексадекан та гліцерин) залежали від природи джерела вуглецю у середовищі для підготовки інокуляту та концентрації моносубстратів у суміші. Синтез ПАР підвищувався у 2,1 – 3,5 рази порівняно з вирощуванням штаму К-8 на моносубстратах. Максимальні значення умовної концентрації ПАР (4,4 та 4,8, відповідно) спостерігалися у разі використання сумішей етанолу і глюкози та гліцерину і глюкози.

Література

1. Білець І.В. Синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів / І.В. Білець, А.Д. Конон, Т.П. Пирог // Харчова промисловість. — 2011. — № 10. — С. 127 – 132.
2. Пирог Т.П. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, Т.А. Шевчук, И.В. Билец // Микробиология. — 2012. — Т. 81, № 5. — С. 611 – 619.
3. Пирог Т.П. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині / Т.П. Пирог, Н.А. Манжула // Наукові праці НУХТ. — 2008. — № 25. — С. 107–109.
4. Пирог Т.П. Штам бактерій *Nocardia vaccinii* К-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин / Т.П. Пирог, Н.А. Манжула // Харчова промисловість. — 2008. — № 7. — С. 29–32.
5. Підгорський В.С. Интенсификация технологий микробного синтеза: Монография / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: Наукова думка, 2010. — 327 с.
6. Banat I. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. Martinotti, L. Fracchia, T. Smyth, R. Marchant // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 87, № 2 — P. 427–444.
7. Makkar R.S. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production / R.S. Makkar, S.S. Cameotra, I.M. Banat // AMB Express — 2011. — Vol. 1, № 5 — P. 2191–0855.
8. Mnif I. Optimization of the nutritional parameters for enhanced production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged culture using response surface methodology / I. Mnif, S. Chaabouni-Ellouze, D. Ghribi // Biotechnol. Res. Int. — 2012. — Vol. 2012. doi:10.1155/2012/795430.
9. Silva G. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology / G. Silva, M. Mack, J. Contiero // Biotechnol. Adv. — 2009. — Vol. 27, № 1 — P. 30 – 39.
10. Pansiripat S. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design/ S. Pansiripat, O. Pornsunthorntawe, R. Rujiravanit, B. Kitiyanan, P. Somboonthanate, S. Chavadej // Biochem. Eng. J. — 2010. — Vol. 26, № 4 — P. 938 – 944.

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ РОСТЕ NOCARDIA VACCINII К-8 НА СМЕШАННЫХ СУБСТРАТАХ

Н.В. Кудря

Национальный университет пищевых технологий

Установлена возможность интенсификации синтеза метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами при культивировании *Nocardia vaccinii* К-8 на смеси углеводных и неуглеводных субстратов. Показано, что при выращивании данного штамма на смешанных субстратах условная концентрация ПАВ была больше чем в 2

раза вище по сравнению с использованием соответствующих моносубстратов. Установлено, что природа источника углерода в среде для получения посевного материала значительно влияет на показатели синтеза ПАВ (условная концентрация ПАВ и индекс эмульгирования).

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, бактерии рода *Nocardia*, энергетически неравноценные ростовые субстраты