

SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES UNDER CULTIVATION OF NOCARDIA VACCINII IMV B-7405 AND ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241 ON PRODUCTION WASTES

К. Pokora

National University of Food Technologies

Key words:

Surfactants
Industrial wastes
Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241
Nocardia vaccinii IMV B-7405

Article history:

Received 30.05.2013
Received in revised form 20.06.2013
Accepted 25.06.2013

Corresponding author:

ABSTRACT

The maximal indexes of surfactant synthesis by IMV B-7241 and IMV B-7405 strains were observed when oil containing substrates (fried and refined oil) were used as a carbon source. Under such cultivation conditions, the amount of synthesized surfactants was doubled compared to the cultivation in ethanol- or glycerolcontaining medium. While using molasses (waste of sugar industry) as a substrate, the values of biosynthesis markers of surfactants increased in 1.2 – 1.5 times. Thus, the possibility of utilization of food industry waste by means of synthesis metabolites with surface active properties by *A. calcoaceticus* IMB B-7241 and *N. vaccinii* IMV B-7405 was established.

E-mail:
npnuht@ukr.net

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ ВИРОЩУВАННЯ NOCARDIA VACCINII ІМВ В-7405 І ACINETOBACTER CALCOACETICUS ІМВ В-7241 НА ВІДХОДАХ ВИРОБНИЦТВА

Х.А. Покора

Національний університет харчових технологій

Встановлено здатність *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 до росту та синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) на деяких промислових відходах (м'яса, рідкі парафіни, пересмажена соняшникова олія). Так, за використання як джерела вуглецю, пересмаженої соняшникової олії, показники біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 підвищувались в 1,5 – 2,5 рази порівняно із культивуванням за використання етанолу та гліцерину як джерела вуглецю.

Отримані дані вказують на можливість використання у біотехнологічних процесах побічних продуктів, утворюваних у великих кількостях в різних галузях промисловості для одержання практично цінних метаболітів.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, промислові відходи, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405.

Економічне і великомасштабне виробництво мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) нині ще досі залишається проблемою. Інтенсифікація технології ПАР, в якійсь мірі могла б призвести до підвищення показників синтезу, проте не знизила б витрати на їх виробництво через високу вартість субстратів. Наприклад, ціна препарату «Сурфактин» з ступенем очистки 98 % — 153 долари за 10 мг, емульсану, без попереднього очищення — 50 доларів за кілограм [1].

Звісно вартість хімічних аналогів ПАР на порядок нижча, і становить один долар за кілограм, однак беручи до уваги екологію сьогодення в кінцевому рахунку застосування токсичних засобів завдає нищівної шкоди довкіллю. Використання промислових відходів для виробництва мікробних ПАР є перспективним з економічної точки зору. Такий підхід також дозволяє утилізувати сполуки, які нині є побічними продуктами виробництва і забруднюють навколишнє середовище [1]. У більшості, такі сполуки утилізують спалюючи, як наприклад, у сільському господарстві лігноцелюлозні відходи, що шкодить атмосфері [4]. За останні роки з'являється все більше експериментальних робіт з дослідження здатності до синтезу ПАР мікроорганізмами на промислових відходах. Так, поверхнево-активні речовини *Pseudomonas aeruginosa* синтезовані на безкоштовних побічних продуктах сільського господарства використовували для емульгування вуглеводнів у ґрунті, а також впливали на нативну мікрофлору у лабораторних умовах [2]. На прикладі *Azotobacter chroococcum* було показано можливість використання як субстрату для біосинтезу ПАР ліпопептидної природи неочищену нафту та моторну олію, а масштабування процесу на ферментаційне обладнання (3 л ферментер, перемішування при 350 об/хв, 8,0 мг/л розчиненого кисню, 0,5 кг/см² тиску) дозволило підвищити синтез ПАР до 4,6 г/л [3].

Варто зазначити, що за використання, по-перше, низьковартісних субстратів можливо зменшити собівартість кінцевого продукту на 30 %, по-друге, оптимізувавши процес культивування продуцентів (підбір оптимальних компонентів поживного середовища, їх концентрацій, способів культивування) можливо зробити виробництво мікробних ПАР конкурентоспроможним комерційним аналогом [1].

Раніше на кафедрі біотехнології і мікробіології із забрудненого нафтою ґрунту було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [2].

Встановлено здатність даних штамів до синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями на різних гідрофільних і гідрофобних субстратах. Показано, що за хімічною природою ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 є комплексом гліко-, аміно- і нейтральних ліпідів. Гліколіпіди представлені трегалозоміколатами [4, 5]. Встановлено оптимальні умови культивування штамів, що забезпечують максимальний синтез ПАР [2 – 5], показана можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин внесенням у середовище екзогенних поперед-

ників біосинтезу [5 – 7], досліджено особливості метаболізму ростового субстрату, а також здійснено масштабування процесів біосинтезу ПАР на ферментаційному обладнанні [8].

Мета даної роботи — дослідження можливості використання відходів виробництва як дешевих ростових субстратів для синтезу ПАР *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B – 7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі наступного складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, рН 6,8 – 7,0. Додатково до мінерального поживного середовища вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Розчин мікроелементів має наступний склад (г/100мл): $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,6; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004; $\text{H}_3\text{BO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,006; KI — 0,0001; трилон-Б — 0,5.

Для культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 використовували поживне середовище 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; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1. У середовище культивування додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка).

Джерело вуглецю та енергії: м'яса 2% (масова частка), етанол, рідкі парафіни, пересмажена (відходи від закладів громадського харування) і рафінована олія, а також молочна сироватка у концентрації 2 % (об'ємна частка). В контрольних варіантах штам IMB B-7241 культивували на середовищі з етанолом, а IMB B-7405 — гліцерином.

Як посівний матеріал використовували культури з експоненційної фази росту, вирощених на відповідних рідких поживних середовищах. Інокулят вносили в концентрації 10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С впродовж 120 год.

Синтез ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг супернатанту культуральної рідини (σ_s), умовна концентрація ПАР (ПАР*, безрозмірна величина), концентрація ПАР (г/л), індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини [2 – 4].

Всі досліді проводили у трьох повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили по Лакіну [9].

Раніше [10], вже було показано, що штам *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 здатний використовувати для росту як гідрофільні (етанол, глюкоза), так і гідрофобні (гексадекан) субстрати, синтезуючи при цьому ПАР гліко-, нейтральної і пептидоліпідної природи. Проте, як вже було описано вище, використання промислових відходів було б альтернативним вирішенням здешевлення технології біосинтезу мікробних поверхнево-активних речовин.

Показано, що *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 здатні синтезувати ПАР на всіх досліджених субстратах, крім молочної сироватки. Максимальні показники біосинтезу ПАР зафіксовано при культивуванні штамів IMB B-7241 і IMB B-7405 на олієвмісних субстратах: підвищення умовної концентрації ПАР в 1,5 – 2,5 рази в порівнянні з показниками на середовищі з

етанолом для штаму ІМВ В-7241 або гліцерином для ІМВ В-7405, як контрольні варіанти (рис. 1, 2).

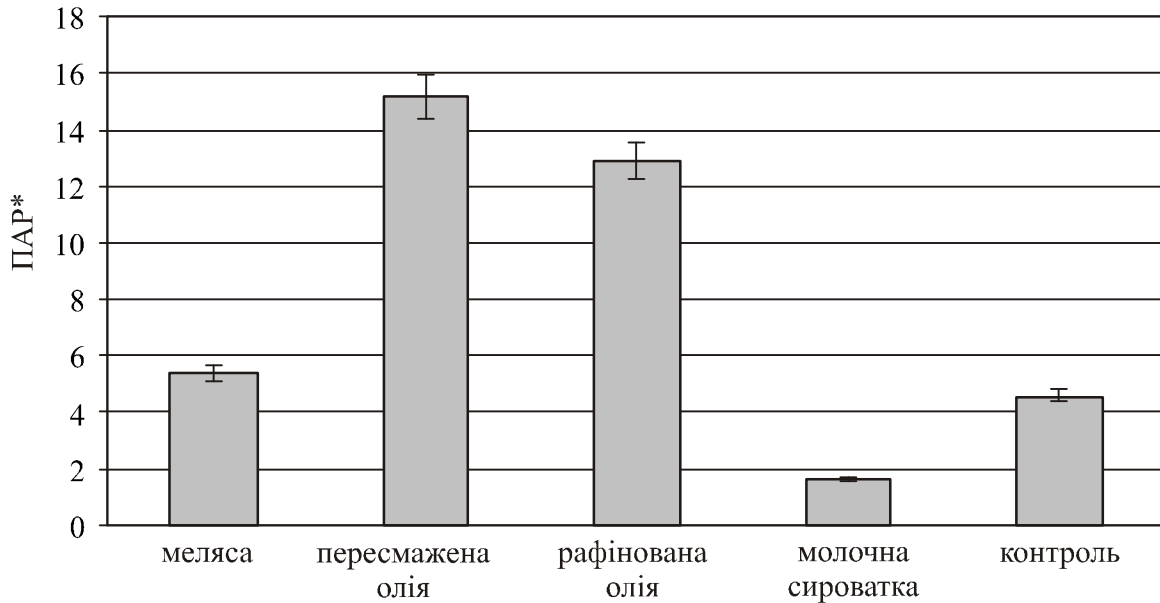


Рис. 1 Синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва

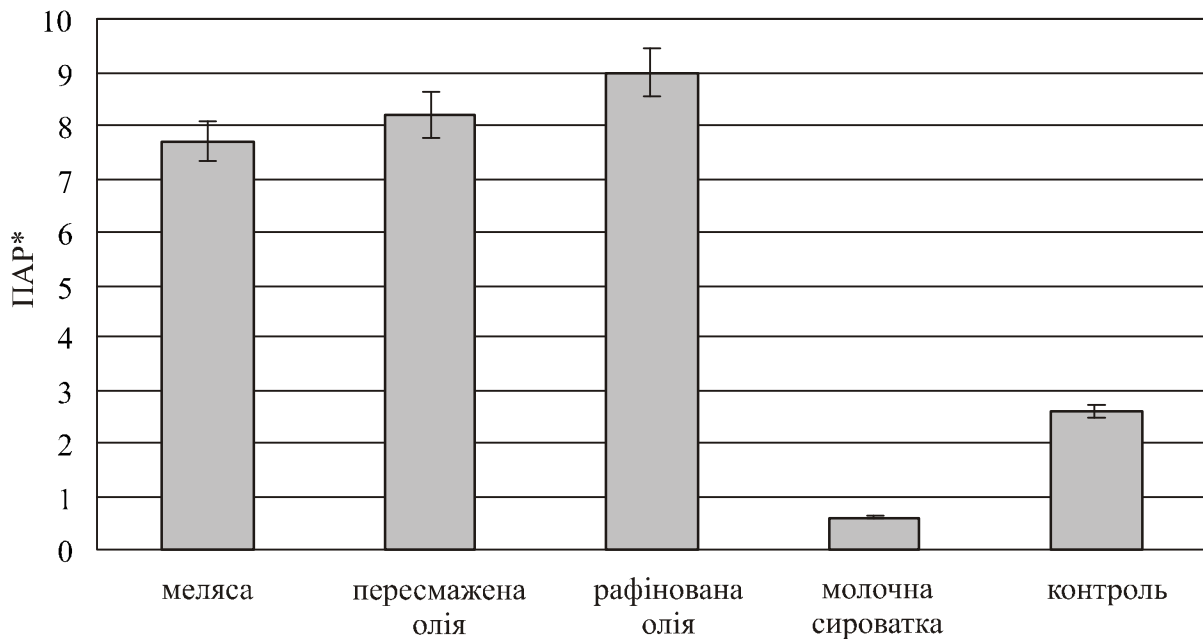


Рис. 2 Біосинтез поверхнево-активних метаболітів *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах

У разі використання м'яси як джерела вуглецю для *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 спостерігали збільшення кількості синтезованих ПАР на 80 – 196 %, а олієвмісних субстратах — на 40 % у порівнянні з вирощуванням на етанол- і гліцеринвмісних середовищах.

Слід зазначити, що індекс емульгування (E_{24} , %) був найвищим для штаму ІМВ В-7241 (45 – 53 %) при культивуванні на м'ясі; при рості на олії і молочній сироватці цей показник знизився до 42 – 50 %. За умов росту

N. vaccinii ІМВ В-7405 на всіх досліджуваних субстратах значення індексу емульгування практично не змінювалося (45 – 55 %). Найвищий рівень біомаси спостерігався при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рафінованій олії (1,83 г/л), що у 2 рази вище, аніж на етанолвмісному середовищі (0,87 г/л). Високі показники також спостерігалися за умов росту на пересмаженій олії (1,51 г/л). Найнижчий синтез біомаси спостерігався за вирощування на молочній сироватці (0,3 г/л).

Висновок

Отже, дослідженнями було встановлено, що бактерії *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здатні рости на середовищах, де як джерело вуглецю використовуються промислові відходи і при цьому синтезувати метаболіти з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями. За останні роки з'являється все більше робіт у цьому напрямку досліджень. Так, молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis*, які потребують для росту складних та дорогих поживних середовищ вирощували [11] на відходах винного виробництва. При цьому було показано, що за таких умов культивування собівартість біосинтезу поверхнево-активних речовин можна зменшити у декілька разів.

Література

1. *Randhir S.M.* Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production / Swaranjit S.C., Banat I.M. // *AMB Express*. — 2011. — Vol. 1, № 5. — P. 1 – 19.
2. *Benincasa M.* Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil // *Curr Microbiol*. — 2007. — Vol. 54, № 6. — P. 445 – 449
3. *Thavasi R., Subramanyam Nambaru V.R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M.* Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment // *Mar. Biotechnol. (NY)*. — 2009. — Vol. 11, № 5. — P. 551 – 556.
4. *Benincasa M., Accorsini F.R.* *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate // *Bioresour Technol*. — 2008. — Vol. 99, № 9. — P. 3843 – 3849
5. *Пурог Т.П.* Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология*. — 2005. — Т. 41. № 1. — С. 58 – 63.
6. *Пурог Т.П.* Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах / Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // *Прикл. биохимия и микробиология*. — 2004. — Т. 40. № 5. — С. 544 – 550.
7. *Пурог Т.П.* Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ / Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. — 2009. — Т.45. № 3. — С. 304 – 310.

8. Пирог Т.П. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля / Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73. № 4. — С. 15 – 24.

9. Пирог Т.П. Интенсификация синтеза поверхностно – активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на н-гексадекане / Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. — 2010. — Т. 46. № 6. — С. 651 – 658.

10. Пирог Т.П. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином / Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. // Микробиол. журнал. — 2012. — Т. 74. № 1. — С. 20 – 27.

11. Пирог Т.П. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане / Игнатенко С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. — 2011. — Т. 47. № 4. — С. 436 – 442

12. Лакин Г.Ф. Биометрия — М.: Высшая школа — 1990. — 352 с.

13. Пирог Т.П. Особливості окиснення етанолу *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 — продуцента поверхнево-активних речовин / Шевчук Т.А., Дугінець О.С. // Мікробіологічний журнал. — 2010. — Т. 72, № 6. — С. 3 – 10.

14. Rodríguez N. Use of waste materials for *Lactococcus lactis* development / Torrado A., Cortés S., Domínguez J.M. // J. Sci. Food. Agric. — 2010. — Vol. 90, N 10. — P. 1726 – 1734.

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В УСЛОВИЯХ ВЫРАЩИВАНИЯ ACINETOBACTER CALCOACETICUS ИМВ В-7241 И NOCARDIA VACCINII ИМВ В-7405 НА ОТХОДАХ ПРОИЗВОДСТВА

К. Покора

Национальный университет пищевых технологий

Установлена способность *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N.vaccinii* ИМВ В-7405 к росту и синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ) на некоторых промышленных отходах (меласса, жидкие парафины, пережаренное подсолнечное масло). Так, за использование в качестве источника углерода, пережаренного подсолнечного масла, показатели биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405 повышались в 1,5-2,5 раза по сравнению с культивированием за использование этанола и глицерина в качестве источника углерода. Полученные данные указывают на возможность использования в биотехнологических процессах побочных продуктов, образующихся в больших количествах в различных отраслях промышленности для получения практически ценных метаболитов.

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, промышленные отходы, Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405.