

EFFECT OF EXOGENOUS PRECURSORS ON BIOSURFACTANTS SYNTHESIS UNDER *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 CULTIVATION ON INDUSTRIAL WASTE

K. Beregova

National University of Food Technologies

Key words:

Industrial waste
Nocardia vaccinii IMB
B-7405
Exogenous precursors

Article history:

Received 06.10.2014
Received in revised form
25.10.2014
Accepted 15.11.2014

Corresponding author:

K. Beregova
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The possibility of intensification of microbial surface-active agents (biosurfactants) synthesis by addition of exogenous precursors into cultivation medium of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 was investigated. Adding 0,1 % glucose into medium with fried sunflower oil (2 %) in exponential growth phase of *N. vaccinii* IMB B-7405 and using inoculum grown on molasses was accompanied by increase in concentrations of biosurfactants in 2,6 times compared with cultivation without precursors. It was established that after addition of 0,05 % fried sunflower oil into medium with molasses (2 %) and using inoculum grown on oil contained medium the amount of synthesized surfactants increased by 2,8 times in comparison with those without oil. Obtained results can be used to improve the technology of *N. vaccinii* IMB B-7405 biosurfactants on industrial waste.

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ПОПЕРЕДНИКІВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ

Х.А. Берегова

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість інтенсифікації синтезу мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) за рахунок додавання екзогенних попередників у середовище культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. Внесення в експоненційній фазі росту *N. vaccinii* IMB B-7405 0,1 % глюкози у середовище з пересмаженою соняшниковою олією (2 %) і використання інокуляту, вирощеного на мелясі, призводило до підвищення концентрації синтезованих ПАР у 2,6 рази порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без попередника. Встановлено, що додавання на початку процесу культивування 0,05 % пересмаженої соняшникової олії у середовище з мелясою (2 %) і використання посівного матеріалу, вирощеного на олії, супроводжувалось підвищенням кількості ПАР у 2,8 рази порівняно з показниками на середовищі без олії. Отримані

дані можуть бути використані для вдосконалення технології синтезу мікробних ПАР штамом ІМВ В-7405 на промислових відходах.

Ключові слова: промислові відходи, *Nocardia vacciniі* ІМВ В-7405, екзогенні попередники.

Потреби людства у поверхнево-активних речовинах (ПАР) є досить значними. Так, у 2007 р. виробництво ПАР досягло близько 10 млн т [1], проте більшість з них є хімічно синтезованими, тому їх використання є небажаним, оскільки шкодить довкіллю. Альтернативою синтетичним аналогам є мікробні ПАР — нетоксичні, біодеградабельні і стійкі у широких межах температури та рН [1]. Перспективним напрямком застосування мікробних ПАР є очищення навколишнього середовища від комплексних забруднень [3], а завдяки високій біологічній активності даний клас сполук може бути використаний у медицині і сільському господарстві для створення антимікробних й антиадгезивних препаратів [6]. Проте, незважаючи на очевидні переваги мікробних ПАР перед синтетичними аналогами, їх промислове виробництво є нерентабельним через високу вартість субстратів для біосинтезу і низький вихід кінцевого продукту. З іншого боку, проблемою сьогодення є необхідність утилізації значної кількості промислових відходів, як, наприклад, пересмаженої соняшникової олії: тільки у США в середньому на тиждень утворюється 100 млрд л олієвісних відходів [6], а Європа, як і раніше, є найбільшим виробником біодизелю (до 2400 тис. м³ у рік), з якого у великих кількостях як побічні продукти утворюються гліцерин, метанол, солі, мила [3].

Відомо [1—6], що мікроорганізми можуть використовувати відходи різних галузей промисловості для синтезу практично цінних метаболітів. При споживанні технічного гліцерину бактеріями *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 синтезується 59,5 г/л 1,3-пропандіолу [4]. *Lactococcus lactis*, які широко використовуються у харчовій промисловості як пробіотичні штами, є ауксотрофами та потребують дорогих селективних середовищ, проте у [5] показано можливість біосинтезу молочної кислоти та ПАР *Lactococcus lactis* СЕСТ-4434 на виноградній лозі й винному дистилляті (концентрація молочної кислоти — 14,3 г/л, ПАР — 1,7 мг/л). У [2] досліджено синтез ПАР мутантним штамом *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 з використанням ряду пересмажених олій як джерел вуглецю та за наявності попередника рамноліпідної природи в умовах періодичного культивування. Концентрація синтезованих ПАР *P. aeruginosa* EBN-8 на пересмаженій олії підвищувалась до 4,1 г/л за внесення на початку культивування 0,05 г/л рамноліпідів, тоді як без додавання попередника становила 3,3 г/л [2]. Бактерії *Ochrobactrum anthropi* 2/3 на середовищі з 25 % пальмової олії й 1 % глутамату натрію синтезували 4,52 г/л ПАР, які підвищували розчинність поліароматичних вуглеводнів у ґрунті [7]. Наведені дані про здатність мікроорганізмів синтезувати ПАР на різноманітних відходах є досить цікавими, проте вимагають подальших досліджень з метою реалізації біосинтезу у промислових масштабах.

Об'єкт досліджень. Штам *Nocardia vacciniі* ІМВ В-7405 виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту та зареєстрований в Депозитарії мікро-

організмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7405 [8]. Встановлено здатність даного штаму синтезувати метаболіти з поверхнево-активними властивостями на гідрофобних і гідрофільних субстратах [8—10]. Показано, що за хімічною природою ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є комплексом гліко-, аміно- і нейтральних ліпідів (гліколіпіди представлені трегалозоміколами) [8]. Встановлено оптимальні умови культивування штаму на гліцерині, що забезпечують максимальний синтез ПАР [9], зокрема внесення у середовище цитрату натрію (регулятор синтезу ліпідів) і С₄-дикарбонових кислот (попередники глюконеогенезу) [9, 10].

Мета статті. Дослідити можливість інтенсифікації синтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій (пересмаженій) соняшниковій олії і мелясі за наявності екзогенних попередників вуглеводної і ліпідної природи.

Методи досліджень. Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ — 0,5; MgSO₄×7H₂O — 0,1; CaCl₂×2 H₂O — 0,1; KH₂PO₄ — 0,1; FeSO₄×7H₂O — 0,1. Як джерело вуглецю використовували пересмажену соняшкову олію та мелясу у концентрації 2 % (об'ємна та масова частка за вуглеводами відповідно). У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). В одному з варіантів на початку процесу культивування, в експоненційній і стаціонарній фазі росту штаму ІМВ В-7405, у середовище з пересмаженою соняшничковою олією додатково вносили глюкозу (0,05—0,1 %), а в середовище з мелясою — пересмажену соняшкову олію (0,05—0,1 %). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5% соняшничкової олії або меляси. Кількість інокуляту — 10 % від об'єму середовища. Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год [8, 9].

Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції ПАР з супернатанту, який одержували центрифугуванням постферментаційної культуральної рідини упродовж 45 хв при 5000 об/хв. Для екстракції поверхнево-активних ліпідів у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл вносили 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол, 2:1), струшували (з метою екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і проводили екстракцію ліпідів протягом 5 хв. Після розділення фаз збирали нижню фракцію й отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 упарювали на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,6 атм до постійної маси. Всі дослідження проводили у трьох повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакінім [11].

Результати і обговорення. Ідея внесення у середовище з гліцерином цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і фумарату (попередник глюконеогенезу), реалізована у попередніх дослідженнях [10], базувалась на тому, що *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує комплекс аміно-, гліко- та нейтральних ліпідів.

Оскільки основним компонентом гліколіпідів є трегалозоміколати, то цілком можливо, що додавання у середовище із соняшниковою олією глюкози буде супроводжуватись підвищенням синтезу ПАР.

Таблиця 1. Вплив глюкози на синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7405 на соняшниковій олії (2 %)

Субстрат для одержання інокуляту	Концентрація глюкози, %	Момент внесення глюкози (фаза росту)	Концентрація ПАР, г/л
Меляса негідролізована	0,1	Лаг-фаза	3,6 ± 0,18
		Експоненційна	4,9 ± 0,24
		Стационарна	1,6 ± 0,08
	0,05	Лаг-фаза	2,6 ± 0,13
		Експоненційна	3,2 ± 0,16
		Стационарна	4,3 ± 0,21
0	Контроль (без глюкози)	1,9 ± 0,09	
Пересмажена олія	0,1	Лаг-фаза	3,9 ± 0,19
		Експоненційна	2,4 ± 0,12
		Стационарна	3,0 ± 0,15
	0,05	Лаг-фаза	3,1 ± 0,15
		Експоненційна	3,2 ± 0,16
		Стационарна	3,8 ± 0,19
0	Контроль (без глюкози)	1,7 ± 0,03	

Таблиця 2. Вплив соняшникової олії на синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7405 на мелясі (2 %)

Субстрат для одержання інокуляту	Концентрація олії, %	Момент внесення олії (фаза росту)	Концентрація ПАР, г/л
Меляса негідролізована	0,1	Лаг-фаза	1,1 ± 0,05
		Експоненційна	3,5 ± 0,17
		Стационарна	2,0 ± 0,10
	0,05	Лаг-фаза	3,2 ± 0,16
		Експоненційна	3,6 ± 0,18
		Стационарна	4,5 ± 0,22
0	Контроль (без глюкози)	1,6 ± 0,08	
Пересмажена олія	0,1	Лаг-фаза	4,4 ± 0,22
		Експоненційна	3,2 ± 0,16
		Стационарна	1,4 ± 0,07
	0,05	Лаг-фаза	4,7 ± 0,23
		Експоненційна	2,2 ± 0,11
		Стационарна	3,2 ± 0,16
0	Контроль (без глюкози)	1,7 ± 0,03	

З результатів, наведених у табл. 1, видно, що внесення 0,05—0,1 % глюкози у середовище з пересмаженою соняшниковою олією приводило до підвищення концентрації ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у 1,4—2,6 рази порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без глюкози. Концентра-

ція ПАР залежала від способу підготовки інокуляту. Так, за використання меляси як субстрату для одержання посівного матеріалу спостерігали максимальне збільшення концентрації ПАР (у 2,6 раза). Показники синтезу ПАР залежали від моменту внесення глюкози у середовище із соняшниковою олією. Так, за додавання глюкози в експоненційній і стаціонарній фазі росту штаму ІМВ В-7405 кількість синтезованих ПАР становила 4,9 г/л та 4,3 г/л відповідно. Ефект від додавання 0,1 % чи 0,05 % глюкози був практично однаковим, проте з економічної точки зору доцільніше використовувати нижчу концентрацію попередника.

На наступному етапі досліджували вплив пересмаженої соняшникової олії за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на мелясі (табл. 2). Найвищі показники синтезу (4,4—4,7 г/л) спостерігали за внесення 0,05 % олії на початку процесу культивування з використанням інокуляту, вирощеного на олієвмісному середовищі. За використання інокуляту, вирощеного на мелясі, концентрація синтезованих ПАР досягала максимального значення (4,5 г/л) за внесення 0,05 % олії у стаціонарній фазі росту.

Висновки

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено можливість підвищення синтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах (мелясі та пересмаженій соняшниковій олії) внесенням екзогенних попередників вуглеводної й ліпідної природи.

Встановлено, що додавання в середовище із соняшниковою олією 0,05—0,1 % глюкози, а в середовище з мелясою 0,05—0,1 % соняшникової олії супроводжувалось підвищенням показників синтезу ПАР у 1,3—2,8 раза.

Література

1. *Randhir S.M.* Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production / S.C. Swaranjit, I.M. Banat / *AMB Express*. — 2011. — Vol. 1, # 5. — P. 1—19.
2. *Raza Z.A.* Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils / M.S. Khan, M.Z. Khalid, A. Rehman / *Biotechnol. Lett.* — 2006. — Vol. 28, # 20. — P. 1623—1631.
3. *Almeida J.R.M.* Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste / L.C.L. Fávoro B.F. Quirino / *Biotechnol. for Biofuels*. — 2012. — Vol. 5, # 48. — In press.
4. *Gonen C.* Comparative evaluation of pumice stone as an alternative immobilization material for 1,3-propanediol production from waste glycerol by immobilized *Klebsiella pneumoniae* / M. Gungormusler, N. Azbar / *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 168, # 8 — P. 2136—2147.
5. *Rodriguez N.* Use of waste materials for *Lactococcus lactis* development / A. Torrado, S. Cortes, J. Domingues / *J. Sci. Food Agric.* — 2010. — Vol. 90, # 10. — P. 1726—1734.
6. *Rufino R.* Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 / J. Luna, L. Sarubbo, L. Rodrigues, J. Teixeira / *Lett. Appl. Microbiol.* — 2011. — Vol. 84, # 1. — P. 1—5.

7. Noparat P. Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3 / S. Maneerat, A. Saimmai // W. J. of Microbiol. and Biotechnol. doi: 10.1007/s11274-013-1493-z. Epub 2013 Oct 1.

8. Пирог Т.П. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Т.А. Шевчук, И.Н. Волошина, Н.Н. Гречирчак // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58—63.

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

10. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.

11. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДАХ

К.А. Береговая

Национальный университет пищевых технологий

*В статье исследована возможность интенсификации синтеза микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) добавлением экзогенных предшественников в среду культивирования *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. Внесение в экспоненциальной фазе роста *N. vaccinii* IMB B-7405 0,1 % глюкозы в среду с пережаренным подсолнечным маслом (2 %) и использование инокулята, выращенного на мелассе, приводило к повышению концентрации синтезированных ПАВ в 2,6 раза по сравнению с культивированием бактерий на среде без предшественника. Установлено, что добавление в начале процесса 0,05 % пережаренного подсолнечного масла в среду с мелассой (2 %) и использование посевного материала, выращенного на масле, сопровождалось повышением количества ПАВ в 2,8 раза по сравнению с показателями на среде без масла. Полученные данные могут быть использованы для усовершенствования технологии синтеза микробных ПАВ штаммом IMB B-7405 на промышленных отходах.*

Ключевые слова: *промышленные отходы, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, экзогенные предшественники.*