

## The specifics of surfactants synthesis during nocardia vaccinii IMV B-7405 cultivation on mixed substrates

Nadiya Kudrya, Tatiana Pirog

National University of food technologies, Kyiv, Ukraine

---

### ABSTRACT

#### Keywords:

Nocardia vaccinii  
IMB B-7405  
Surfactants  
Mixed substrates  
Intensification  
Biosynthesis

---

#### Article history:

Received 29.01.2013  
Received in revised form  
26.03.2013  
Accepted 26.04.2013

---

#### Corresponding author:

Nadiya Kudrya  
E-mail:  
ms.nelli@rambler.ru

Production of surface-active agents (surfactants) is highly promising direction in the industry, since such connections have several advantages over synthetic analogs. Surfactants are widely used in various industries (environmental technologies, food processing, agriculture, medicine). One approach of improving their biosynthesis is the combination of unequal energy substrates, avoiding unnecessary loss of carbon and energy, and increasing the conversion of carbon in biomass or practically valuable secondary metabolites. The possibility of intensification of surfactant synthesis in *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 on mixed substrates was investigated (hexadecane and glucose, ethanol and glucose, hexadecane and glycerol, glucose and glycerol). Concentration of each monosubstrate in the mixture was 0.5 and 1.0%. After cultivation process conventional surfactant concentration and emulsification index parameters were measured. Found that conventional surfactant concentration on mixed substrates was 2.1-3.5 times higher in comparison with the corresponding monosubstrates. The maximum values of conventional surfactant concentrations (4.4 and 4.8, respectively) were observed using a mixture of glucose to ethanol or glycerol. The dependence of the surfactant synthesis indexes on the nature of the carbon source in the medium for inoculum was set. The results confirm the effectiveness of the use of a mixture of growth substrates for surfactants *N. vaccinii* IMB B-7405.

---

УДК 759.873.088.5:661.185

## Особливості синтезу поверхнево-активних речовин nocardia vaccinii IMB B-7405 на суміші ростових субстратів

Кудря Надія, Пирог Тетяна

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

## Вступ

Нині особливу увагу науковців привертають поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження у зв'язку з тим, що вони є ефективнішими, екологічно безпечнішими, стабільнішими у широкому діапазоні рН та температур порівняно з синтетичними аналогами [3]. Мікробні ПАР можуть знайти масштабне практичне використання у природоохоронних технологіях, харчовій промисловості, сільському господарстві та медицині [1, 2]. Саме тому актуальним напрямком досліджень сьогодення є оптимізація технологій їх біосинтезу. Як свідчать літературні дані [7], одним із потенційних шляхів підвищення ефективності синтезу ПАР є використання суміші субстратів. Комбінація енергетично нерівноцінних субстратів дає змогу уникнути непродуктивних втрат вуглецю та енергії, що мають місце у разі використання мікроорганізмами моносубстрату, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у практично цінні вторинні метаболіти. Так, у разі культивування *Candida bombicola* ATCC 22214 використовувалась суміш сахарози (125 г/л) та олеїнової кислоти (166 г/л) замість стандартних середовищ з глюкозою [4]. При використанні змішаних субстратів, синтез софороліпіду дріжджами підвищувався у 3 рази.

Встановлено [6], 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 моносубстратах.

У попередніх дослідженнях [10] із забрудненого нафтою зразка ґрунту було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і встановлено його здатність до синтезу ПАР. Штам К-8 депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером ІМВ В-7405.

Мета даної роботи – дослідити можливість підвищення синтезу поверхнево-активних речовин при культивування штаму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші ростових субстратів (гексадекан і глюкоза, етанол і глюкоза, гексадекан і гліцерин, глюкоза і гліцерин).

## Методи досліджень

Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 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;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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 моносубстратів 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* ІМВ В-7405 з експоненційної фази росту, вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами вуглецю у середовищі для одержання інокуляту були моносубстрати у концентрації 0,5 %, а також суміш субстратів (по 0,25 % кожного з моносубстратів). 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°C.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1. Поверхневий натяг ( $\sigma_s$ ) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина).

2. 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  $\sigma_s$  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\*.

3. Індекс емульгування (E24, %) нативної культуральної рідини. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

### Результати та обговорення

На першому етапі досліджували показники синтезу ПАР на суміші етанолу та глюкози (див. табл. 1).

Таблиця 1.

Синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші етанолу та глюкози

Концентрація джерела вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Концентрація джерела вуглецю у середовищі для інокуляту, %	Показники синтезу ПАР	
		ПАР*	E <sub>24s</sub> %
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 ± 0,10	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 ± 0,20	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

Примітка. Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглицем. Концентрація глюкози наведена у % (масова частка), етанолу у % (об'ємна частка).

Встановлено, що незалежно від концентрації монособстратів у суміші максимальний показник ПАР\* (4,0–4,4) та індекс емульгування (65 %) спостерігалися у разі використання інокуляту вирощеному на змішаних субстратах. При цьому умовна

концентрація ПАР була у 2 рази, а показник  $E_{24}$  у 1,2–1,3 рази вищі порівняно з показниками на відповідних моносубстратах.

Наступний етап був присвячений дослідженню можливості підвищення синтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гексадекану і глюкози.

На відміну від використання суміші етанолу і глюкози, у разі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 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. 2).

Слід зауважити, що у разі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гексадекану та глюкози, оптимальним джерелом карбону у середовищі для одержання інокуляту виявився відповідний змішаний субстрат. Раніше [6] 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.

**Таблиця 2**  
**Синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 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	Гексадекан 0,5	0,5 ± 0,03	54 ± 2,7
Глюкоза, 1,14	Глюкоза 0,5	2,6 ± 0,23	48 ± 2,4

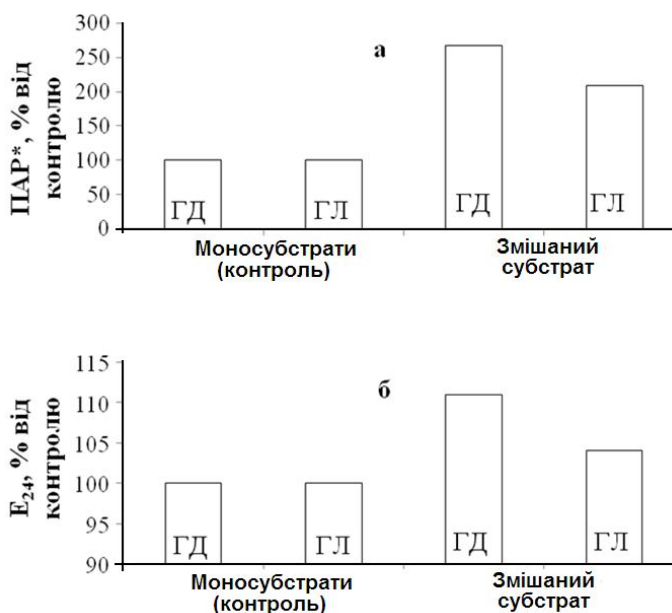
Примітка. Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглицем. Концентрація глюкози наведена у % (масова частка), гексадекану у % (об'ємна частка).

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 [8]. 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.

Третій етап був присвячений дослідженню синтезу ПАР штамом ІМВ В-7405 на суміші гексадекану і гліцерину (рисунок).

З даних, наведених на рисунку, видно, що умовна концентрація ПАР і індекс емульгування за умов росту штаму ІМВ В-7405 на суміші гексадекану та гліцерину підвищувалися на 11–167 %, порівняно з відповідними моносубстратами. Раніше було встановлено, що за умов культивування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на такому самому змішаному субстраті показники синтезу ПАР зростали на 18–322 % [6].



**Рис. 1.** Умовна концентрація ПАР (а) і індекс емульгування (б) за умов росту *N. vacciniі* ІМВ В-7405 на суміші гексадекану (1,0 %) та гліцерину (1,0 %).

Контроль (100 %) – показники синтезу на моносубстраті гексадекані (ГД) і гліцерині (ГЛ).  
Інокулят вирощений на середовищі з гексадеканом і гліцерином.

На наступному етапі досліджували особливості синтезу ПАР штамом ІМВ В-7405 на суміші гліцерину і глюкози (табл. 3).

**Таблиця 3**  
**Показники синтезу ПАР за умов росту *N. vacciniі* ІМВ В-7405 на суміші гліцерину (0,5 %) та глюкози (0,5 %)**

Джерело вуглецю в середовищі для отримання інокуляту	ПАР*, % від контролю		E <sub>24</sub> , % від контролю	
	Гліцерин	Глюкоза	Гліцерин	Глюкоза
Гліцерин + Глюкоза	286 ± 14,3	353 ± 17,6	97 ± 4,8	107 ± 5,3
Гліцерин	121 ± 6,1	200 ± 10,0	92 ± 4,6	102 ± 5,1
Глюкоза	107 ± 5,4	176 ± 8,8	100 ± 5,0	110 ± 5,5

Примітка. Контроль (100 %) – показники синтезу на відповідних моносубстратах, в яких концентрація вуглецю еквімолярна концентрації змішаного субстрату.

Гліцерин є одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах, оскільки він утворюється у великих кількостях як побічний продукт у виробництві біодизелю [5]. У роботі [9] показано можливість використання гліцерину штамом ІМВ В-7405 для синтезу ПАР.

Як видно з даних наведених у табл. 3 показник умовної концентрації ПАР за використання суміші гліцерину та глюкози підвищувався на 21–253 % порівняно з вирощуванням штаму ІМВ В-7405 на моносубстратах. Максимальне підвищення ПАР\* спостерігали у разі використання посівного матеріалу, вирощеного на відповідній суміші, при цьому індекс емульгування майже не змінювався. При підвищенні концентрації моносубстратів у суміші до 1 % спостерігалися схожі закономірності.

## Висновок

У процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на змішаних субстратах (етанол та глюкоза, гліцерин та глюкоза, гексадекан та гліцерин) показники синтезу ПАР підвищувалися у 2,1–3,5 рази порівняно з вирощуванням штаму ІМВ В-7405 на моносубстратах. Максимальні значення умовної концентрації ПАР (4,4 та 4,8, відповідно) спостерігалися у разі використання суміші етанолу і глюкози та гліцерину і глюкози. Показники синтезу ПАР на змішаних субстратах залежали від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту та концентрації моносубстратів у суміші.

## Література

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Білець І.В. Синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів / І.В. Білець, А.Д. Конон, Т.П. Пирог // *Харчова промисловість.* – 2011. – № 10. – С. 127–132.
7. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу: Монографія./ В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог – К.: Наукова думка, 2010. – 327 с.
8. Пирог Т.П. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на суміші гексадекана і гліцерину / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, Т.А. Шевчук, І.В. Білець // *Мікробіологія.* – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 611–619.

—**Біотехнологія, мікробіологія**—

9. Пирог Т.П. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vacciniі* К-8 на гліцерині / Т.П. Пирог, Н.А. Манжула // Наукові праці НУХТ. – 2008. – № 25. – С. 107–109.
10. Пирог Т.П. Штам бактерій *Nocardia vacciniі* К-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин / Т.П. Пирог, Н.А. Манжула // Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 29–32.