

**SYNTHESIS OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405  
BIOSURFACTANTS ON MIXTURE OF MOLASSES WITH  
ETHANOL AND GLYCEROL**

**T. Pirog, N. Kudrya, K. Beregova**  
*National University of Food Technologies*

**Key words:**

*Nocardia vaccinii* IMB  
B-7405  
Biosurfactants  
Cultivation  
Mixed substrates  
Intensification of biosyn-  
Thesis  
Molasses  
Ethanol  
Glycerol

**ABSTRACT**

The possibility of replacing glucose in mixture with ethanol and glycerol for biosynthesis of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants on cheaper substrate molasses (sugar production waste) was studied. The dependence of surfactants synthesis under cultivation of *N. vaccinii* IMV B-7405 in medium, containing mixture of ethanol and molasses, glycerol and molasses on the nature of the carbon source in the medium for the inoculum obtaining and monosubstrate concentration in the mixture was established. The highest rates of synthesis (concentration of extracellular surfactant 3,5—3,9 g/l, emulsification index of culture liquid 59—61 %) were observed when inoculum was grown on mixed substrates. Under such cultivation conditions of *N. vaccinii* IMV B-7405 the surfactant concentration was 1,3—2,7 times higher than the corresponding monosubstrates. The increasing of monosubstrates concentration in mixture with 0.5 to 1.0 % was not accompanied by a significant increase of surfactants synthesis.

**Article history:**

Received 19.11.2013  
Received in revised form  
01.12.2013  
Accepted 17.12.2013

**Corresponding author:**

T. Pirog  
E-mail:  
tapirog@nuft.edu.ua

**СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН  
*NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА СУМІШІ МЕЛЯСИ  
З ЕТАНОЛОМ І ГЛІЦЕРИНОМ**

**Т.П. Пирог, Н.В. Кудря, Х.А. Берегова**  
*Національний університет харчових технологій*

У статті досліджено можливість заміни глюкози у суміші з етанолом і гліцерином для біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на дешевий субстрат меляси (відхід цукрового виробництва). Встановлено залежність синтезу ПАР на суміші етанолу і меляси, гліцерину й меляси від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту та концентрації моносубстратів у суміші. Найвищі показники синтезу (концентрація позаклітинних ПАР 3,5—3,9 г/л, індекс емульгування культуральної рідини 59—61 %) спостерігалися за використання посівного матеріалу, вирощеного на змішаних субстратах. За таких умов культивування концентрація ПАР була в 1,3—2,7 раза вищою, ніж на відповідних

моносубстратах. Підвищення концентрації моносубстратів у суміші з 0,5 до 1,0 % не супроводжувалося суттєвим збільшенням показників синтезу поверхнево-активних речовин.

**Ключові слова:** *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхнево-активні речовини, культивування, змішані субстрати, інтенсифікація біосинтезу, меляса, етанол, гліцерин.

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) використовуються у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем [1–4]. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [1–4].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі, є великі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення й очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [5].

Одним із шляхів інтенсифікації технологій мікробного синтезу практично важливих метаболітів є використання для їх одержання суміші ростових субстратів [6].

Донедавна у літературі було відносно небагато повідомлень про використання змішаних субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин, однак наразі такий відносно простий шлях інтенсифікації синтезу ПАР привертає все більше уваги [7–13].

Наші дослідження показали можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол, глюкоза) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [10–13]. Слід зазначити, що за умов росту досліджуваних штамів на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (етанол, гліцерин, глюкоза) субстратів показники синтезу ПАР були у 1,5–3,5 раза вищими, ніж на відповідних моносубстратах. Також встановлено залежність синтезу ПАР від способу підготовки інокуляту і концентрації моносубстратів у суміші.

У праці [13] встановлено, що максимальні значення умовної концентрації ПАР (4,4 та 4,8, відповідно) спостерігалися за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші глюкози з етанолом або гліцерином.

Оскільки у біотехнології перевага надається дешевим ростовим субстратам, що зазвичай є відходами інших виробництв, мета даної роботи — дослідження можливості заміни глюкози у змішаних субстратах для біосинтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на дешевшу мелясу.

Основний об'єкт досліджень ізольований нами із забрудненого нафтою зразка ґрунту та ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8. Штам К-8

депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером ІМВ В-7405.

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;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ —0,001. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин, етанол, мелясу, 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 і гліцерину, масова за вуглеводами — меляси). Моно- та змішані субстрати, які використовувалися, 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 монособстрати у концентрації 0,5 %, а також суміш субстратів (по 0,25 % кожного). 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 120 год при 30 °С.

Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча. Культуральну рідину, отриману після культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405, центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв для відділення біомаси. 25 мл супернатанту поміщали в циліндричну ділительну воронку об'ємом 100 мл, додавали 5 мл 1М НСІ, воронку закривали пришліфованою пробкою і струшували 3 хв, потім додавали ще 4 мл 1М НСІ і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і 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. Під час повторної екстракції до водної фази додавали 9 мл 1М НСІ і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз нижню фракцію збирали й отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 змішували і випарювали на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм. до постійної маси.

Емульгвальні властивості (індекс емульгування) досліджуваних зразків визначали так: до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл соняшникової олії (субстрат для емульгування) та струшували упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування ( $E_{24}$ ) проводили через 24 год. як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у %.

У працях останніх років, присвячених синтезу мікробних ПАР на суміші ростових субстратів, дослідження фокусуються на використанні промислових відходів як джерел вуглецю й енергії (меляси, молочної сироватки, відпрацьованих рослинних олій, технічного гліцерину — відходу виробництва біодизелю тощо) [8–9, 14, 15].

## БИОТЕХНОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ

Так, додавання 1 % оливкової олії під час культивування *Brevibacterium aureum* на мелясі супроводжувалося збільшенням показників утворення бревифактину на 33—47 % порівняно з культивуванням штаму на середовищі без олії [7].

У праці [9] описано підвищення синтезу софороліпідів *Starmerella bombicola* NRRLY-17069 на суміші гідрофільних субстратів (глюкоза та депротейнізована сироватка у концентрації 10 та 90 г/л відповідно). За таких умов спостерігали підвищення кількості синтезованих ПАР до 14,88 г/л порівняно з 5,62 г/л на сироватці як моносубстраті (100 г/л).

У праці [14] досліджували синтез манозилеритритолліпідів *Pseudozyma hubeiensis* Y10BS025 на суміші кількох субстратів. Встановлено, що за умов росту штаму Y10BS025 на середовищі з глюкозою і технічним гліцерином у співвідношенні 75:25 з додаванням соєвої олії (8 %, об'ємна частка) концентрація ПАР на 8 добу становила 115 г/л і була вищою, ніж за внесення оливкової олії (65 г/л).

Здатність до синтезу ПАР на гідролізованому технічному гліцерині також показано для *Starmerella bombicola* ATCC 22214 [15]. Під час росту штаму ATCC 22214 на суміші гідролізованого гліцерину (15 %) і соняшникової олії (10 %) кількість синтезованих софороліпідів становила 6,36 г/л. Заміна гідролізованого гліцерину на очищений супроводжувалася незначним підвищенням кількості ПАР (6,6 г/л).

Вирощування *Candida bombicola* ATCC 22214 на глюкозі (оптимальна початкова концентрація 30 г/л) з періодичним внесенням рапсової олії та підтриманням оптимального рН упродовж 8 діб супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих софороліпідів у 1,8 раза [8].

Слід зазначити, що автори праць [8—9, 14, 15], повідомляючи про підвищення синтезу вторинних метаболітів на суміші субстратів, не враховують кількість вуглецю, що міститься у змішаному і моносубстратах. Разом з тим, не можна порівнювати ефективність використання суміші субстратів, якщо концентрація вуглецю у ній не еквімолярна такій у моносубстратах.

**Таблиця 1. Синтез ПАР *N. vaccinii* IMB В-7405 на суміші етанолу і меляси залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту**

Концентрація джерела вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Концентрація джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Показники синтезу ПАР	
		ПАР, г/л	E <sub>24</sub> , %
Етанол, 0,5 + Меляса, 0,5	Етанол, 0,5	2,9 ± 0,15	56
	Меляса, 0,5	2,8 ± 0,14	61
	Етанол, 0,25 + Меляса 0,5	3,5 ± 0,18	54
Етанол, 1,0	Етанол 0,5	1,5 ± 0,08	50
Меляса, 1,0	Меляса 0,5	1,7 ± 0,09	58
Етанол, 1,0 + Меляса, 1,0	Етанол, 0,5	2,5 ± 0,13	53
	Меляса, 0,5	2,3 ± 0,12	61
	Етанол, 0,25 + Меляса 0,5	3,8 ± 0,19	56
Етанол, 2,0	Етанол 0,5	1,8 ± 0,09	54
Меляса, 2,0	Меляса 0,5	1,4 ± 0,07	53

## БІОТЕХНОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ

**Примітки.** Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглецем. Концентрація етанолу наведена у % (об'ємна частка), а меляси — у % (масова частка за вуглеводами). Під час визначення індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %.

Наші результати показали, що так само, як і за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші етанолу й глюкози [13], у процесі вирощування штаму на суміші етанолу і меляси максимальна концентрація позаклітинних синтезованих ПАР (3,5—3,8 г/л) спостерігалася за використання інокуляту, вирощеного на змішаному субстраті (табл.1). Варто зазначити, за таких умов культивування концентрація ПАР була у 2—2,7 раза вищою, ніж на відповідних моносубстратах. У той же час максимальне значення індексу емульгування культуральної рідини (61 %) досягалося за умов росту *N. Vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші етанолу і меляси з використанням інокуляту, вирощеного на мелясі (табл. 1). Підвищення концентрації моносубстратів у суміші з 0,5 до 1,0 % не супроводжувалося суттєвим підвищенням показників синтезу ПАР.

У табл. 2 наведено показники синтезу поверхнево-активних речовин під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гліцерину і меляси. Концентрація ПАР за використання посівного матеріалу, вирощеного на суміші субстратів, була максимальною (3,8—3,9 г/л) і перевищувала таку на моносубстратах в 1,3—2,3 раза. Так само, як і за умов росту штаму ІМВ В-7405 на суміші етанолу і меляси, у процесі культивування бактерій на суміші гліцерину і меляси індекс емульгування був найвищим (59—61 %) за використання інокуляту, вирощеного на мелясі.

**Таблиця 2. Показники синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гліцерину і меляси**

Концентрація джерела вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Концентрація джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, %	Показники синтезу	
		ПАР, г/л	E <sub>24</sub> , %
Гліцерин, 0,5 + Меляса, 0,5	Гліцерин, 0,5	3,0 ± 0,15	55
	Меляса, 0,5	2,6 ± 0,13	59
	Гліцерин, 0,25 + Меляса 0,5	3,8 ± 0,19	55
Гліцерин, 0,92 Меляса, 1,1	Гліцерин 0,5	2,3 ± 0,12	51
	Меляса 1,0	1,9 ± 0,09	52
Гліцерин, 1,0 + Меляса, 1,0	Гліцерин, 0,5	2,8 ± 0,14	54
	Меляса, 0,5	2,5 ± 0,13	61
	Гліцерин, 0,25 % + Меляса 0,5	3,9 ± 0,19	56
Гліцерин, 1,84 Меляса, 2,2	Гліцерин 0,5	1,7 ± 0,09	51
	Меляса 0,5	2,0 ± 0,10	52

**Примітки.** Концентрації моно- і змішаних субстратів еквімолярні за вуглецем. Концентрація гліцерину наведена у % (об'ємна частка), меляси — у % (масова частка за вуглеводами). Під час визначення індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %.

### Висновки

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено можливість заміни глюкози у суміші з гліцерином і етанолом на дешевий субстрат меляси — відхід цукрової промисловості. За умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші ета-

нолу і меляси, гліцерину і меляси концентрація позаклітинних ПАР зросла у 1,3—2,7 раза порівняно з показниками на відповідних моносубстратах.

Результати розрахунку похибок вимірювання температурного поля дозволяють побудувати адекватну математичну модель прогнозу стану турбогенератора.

### Література

1. *Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł.* Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97, № 6. — P. 2327—2339.
2. *Sachdev D.P., Cameotra S.S.* Biosurfactants in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97, № 3. — P. 1005—1016. doi:10.1007/s00253-012-4641-8.
3. *Nguyen T.T., Sabatini D.A.* Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — Vol. 12, № 2. — P. 1232—1244.
4. *Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2010. — Vol. 34, № 6. — P. 1037—1062.
5. *Sydatk C., Hausmann R.* Microbial biosurfactants // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* — 2010. — Vol. 112, № 6. — P. 615—616.
6. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. - К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
7. *Seghal K. G., Anto T. T., Selvin J., Sabarathnam B., Lipton A.P.* Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture // *Bioresour. Technol.* — 2010. — 101, № 7. — P. 2389—2396.
8. *Daverey A, Pakshirajan K.* Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* — 2010. — V.79, № 1. — P. 246—253.
9. *Kim Y.B., Yun H.S., Kim E.K.* Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture // *Bioresour. Technol.* — 2009. — V.100, № 23. — P. 6028—6032.
10. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Іутинская Г.А. Синтез поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // *Микробиол. журнал.* — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20—27.
11. Шулякова М.О., Пирог Т.П., Шевчук Т.А. Деякі закономірності синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 на суміші ростових субстратів // *Мікробіологія і біотехнологія.* — 2012. — № 1 (17). — С. 57—65.
12. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец И.В. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина // *Мікробіологія.* — 2012. — Т. 81, № 5. — С. 611—618.

13. Кудря Н., Пирог Т. Особенности синтеза поверхностно-активных речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів // Ukrainian food journal. — 2013. — Vol. 2, Iss. 2. — С. 203—209.

14. Sari M., Kanti A., Artika I.M., Kusharyoto W. Identification of *Pseudozyma hubeiensis* Y10BS025 as a potent producer of glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipids // Amer. J. Biochem. Biotechnol. — 2013. — V. 9, № 4. P. 430—437.

15. Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) // Prep. Biochem. Biotechnol. — 2012. — V. 42, № 2. — P. 125—142.

## **СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ NOCARDIA VACCINII IMB B-7405 НА СМЕСИ МЕЛАССЫ С ЭТАНОЛОМ И ГЛИЦЕРИНОМ**

**Т.П. Пирог, Н.В. Кудря, Х.А. Береговая**  
*Национальный университет пищевых технологий*

*В статье исследована возможность замены глюкозы в смеси с этанолом и глицерином для биосинтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) Nocardia vaccinii IMB B-7405 на более дешевый субстрат мелассу (отход сахарного производства). Установлена зависимость синтеза ПАВ на смеси этанола и мелассы, глицерина и мелассы от природы источника углерода в среде для получения инокулята и концентрации моносубстратов в смеси. Наиболее высокие показатели синтеза (концентрация внеклеточных ПАВ 3,5—3,9 г/л, индекс эмульгирования культуральной жидкости 59—61 %) наблюдали при использовании посевного материала, выращенного на смешанных субстратах. В таких условиях культивирования концентрация ПАВ была в 1,3—2,7 раза выше, чем на соответствующих моносубстратах. Повышение концентрации моносубстратов в смеси с 0,5 до 1,0 % не сопровождалось существенным увеличением показателей синтеза поверхностно-активных веществ.*

**Ключевые слова:** *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, культивирование, смешанные субстраты, интенсификация биосинтеза, меласса, этанол, глицерин.