

## СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИНИ НА ВІДХОДАХ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ У *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 ТА *NOCARDIA VACCINII* K-8

Шулякова М.О., Машенко О.Ю., Хом'як Д.І

**Анотація.** Встановлено можливість використання неочищеного гліцерину як субстрату для утворення ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *N. vaccinii* K-8. Присутність хлоридів натрію і калію, а також метанолу або етанолу, не тільки не інгібувала біосинтетичні процеси, а й супроводжувалася підвищенням значення умовної концентрації ПАР на 8–77 %. Утилізації технічного гліцерину таким способом дозволить підвищити рентабельність виробництва біодизелю шляхом біоконверсії його побічного продукту у практично цінні мікробні ПАР.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, промислові відходи, гліцерин, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* K-8.

**Вступ.** Широке використання викопного палива призводить до великих викидів парникових газів і завдає не виправної шкоди навколишньому середовищу. Поточна нестабільність поставок нафти і безперервне коливання цін викликають ще більший інтерес до альтернативних джерел енергії. Така ситуація потребує розв'язання економічних, екологічних і геополітичних питань і займає центральне місце у зацікавленості поновлюваними джерелами енергії [1].

**Методи досліджень.** Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 1,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; pH 6,8–7,0.

*A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували на середовищі такого ж складу за винятком джерела азоту: замість  $\text{NaNO}_3$  в середу вносили  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  в концентрації 0,35 г/л. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка) і  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001 г/л. Розчин мікроелементів містив (г/100 мл):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,1;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,004;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5.

Культивування *N. vaccinii* K-8 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1, pH 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1 % (об'ємна частка).

Як джерело вуглецю та енергії використовували очищений у концентрації 1,0 – 1,5 % (об'ємна частка). Для модифікації складу технічного гліцерину у відповідні мінеральні середовища вищенаведеного складу з очищеним гліцерином вносили NaCl або KCl – 2,5 % (масова частка), та метанол або етанол – 0,3 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культури з середини експоненційної фази росту (48 год. для штаму K-8 – 60 год), вирощену на середовищі наведеного вище складу з 0,5 % гліцерину (для *N. vaccinii* K-8 – з додаванням факторів росту, а для *A. calcoaceticus* IMB

В-7241 – без). 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 (220 об/хв) упродовж 120 год при 30°C.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР – ПАР\*, концентрація ПАР у г/л) визначали як описано раніше [3, 4].

**Результати та обговорення.** Біопаливо, зокрема етанол і біодизель, належать до найперспективніших заміників викопного палива. Біодизель (біодизельне паливо, біонафта тощо) — екологічно чистий вид біопалива, яке отримується із рослинних олій чи тваринних жирів і використовується для заміни нафтового дизельного палива. Найпоширеніший спосіб отримання біодизелю – перестерифікація рослинних олій. На теперішній час у зв'язку зі зростанням обсягів виробництва біодизелю у світі виникає проблема утилізації побічного продукту – гліцерину, причому на кожні 100 літрів біодизелю утворюється майже 10 літрів технічного гліцерину (так звана гліцерінова фракція, що осідає при відстоюванні) [2]. Гліцерінова фракція, крім гліцерину (60–80%), містить велику кількість різних домішок, що робить неможливим його використання в багатьох традиційних сферах застосування гліцерину (наприклад, виробництво харчових продуктів, фармацевтична і косметична промисловість тощо) через підвищену лужність і концентрацію метанолу. Зберігання та утилізація гліцерінової фракції представляє серйозну екологічну проблему, а її очищення є високовартісною технологією.

Таким чином, для підвищення економічної доцільності та рентабельності виробництва біодизелю необхідне розроблення нових альтернативних способів утилізації цього відходу. Розглядаються такі можливі шляхи як спалювання, компостування, а також термохімічна конверсія [1]. Одним із можливих шляхів утилізації утворюваного гліцерину є використання його як субстрату у біотехнологічних процесах для отримання практично цінних продуктів, у тому числі й поверхнево-активних речовин (ПАР) [2, 3]. Причому з мікробіологічної точки зору головним завданням на сьогодні є отримання мікроорганізмів, стійких до інгібіторів, присутніх в неочищеному гліцерині, особливу увагу серед яких необхідно приділяти залишкам метанолу, а також натрієвим або калієвим солям, оскільки відомо, що вони здатні інгібувати ріст клітин [2].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено можливість використання очищеного гліцерину (98%) як джерела вуглецю і енергії для синтезу ПАР штамми *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 та *Nocardia vaccinii* К-8, однак, враховуючи вищезазначене, необхідно було дослідити можливість біоконверсії цими штамми неочищеного гліцерину у поверхнево-активні речовини, що й було метою нашої роботи. Для цього моделювали середній склад гліцерінової фракції за кількістю залишкових спиртів (метанолу або етанолу) та солей натрію або калію (у вигляді хлоридів). Надалі такий субстрат називатимемо «неочищений» гліцерин. Отримані дані наведено у таблиці 1.

Для оцінки кількісного вмісту ПАР в культуральній рідині використовували показник ПАР\*, названий “умовна концентрація ПАР”, який визначали як описано у праці [4].

Як видно з даних, наведених у таблиці, внесення у середовище культивування усіх штамів KCl або NaCl у концентрації 2,5 % приводило до підвищення показників синтезу ПАР на 4–35 %. Наявність цих солей навіть у кількості 5–10 % не спричиняла значного інгібування процесів утворення ПАР (дані не наведено). Це може бути зумовлено стимулюючим впливом катіонів цих металів на активність ферментів

анаплеротичних реакцій та біосинтезу поверхнево-активних речовин досліджуваних штамів. Зокрема, раніше було показано, що під час росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі  $\text{Na}^+$  є активатором фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилази - за присутності у реакційній суміші 100 мМ  $\text{Na}^+$  активність ферменту підвищувалася в 1,2–1,3 рази [5]. У свою чергу, фізіологічне значення цього ферменту під час культивування ІМВ В-7241 на середовищі з етанолом полягає у посиленні глікоконезу, а отже, й підвищенні синтезу поверхнево-активних гліколіпідів.

Таблиця 1  
Синтез ПАР ітамами ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 і К-8 на «неочищеному» гліцерині

Штам	Джерело в вуглецю, %	Вміст хлоридів, %	ПАР*	ПАР*, % від контролю
<i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017	Гліцерин, 1,0	KCl, 2,5	3,1±0,16	119,2±5,96
		NaCl, 2,5	3,5±0,18	134,6±6,73
	Гліцерин, 1,0 + метанол, 0,3	KCl, 2,5 NaCl, 2,5	2,9±0,15 3,3±0,17	111,5±5,58 128,1±6,09
<i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	Гліцерин, 1,0	KCl, 2,5	3,9±0,20	150,0±7,50
		NaCl, 2,5	4,6±0,23	176,9±8,85
	Гліцерин, 1,0 + метанол, 0,3	KCl, 2,5 NaCl, 2,5	2,5±0,13 2,8±0,14	104,2±5,21 116,7±5,84
<i>N. vaccinii</i> К-8	Гліцерин, 1,5	KCl, 2,5	2,9±0,15	116,0 ± 5,80
		NaCl, 2,5	3,2±0,16	128,0 ± 6,40
	Гліцерин, 1,5 + метанол, 0,3	KCl, 2,5 NaCl, 2,5	2,7±0,14 4,2±0,21	108,0 ± 5,40 168,0 ± 8,04
Гліцерин, 1,5 + етанол, 0,3	KCl, 2,5	3,0±0,15	120,0 ± 6,00	
	NaCl, 2,5	3,6±0,18	144,0 ± 7,20	

Примітка. Контроль (100%) - показники синтезу ПАР на середовищі з очищеним гліцерином (1 – 1,5 %).

Заміна у середовищі культивування нітрату калію на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію супроводжувалася підвищенням показників синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 під час росту на гексадекані у 1,5–2 рази [5]. Такий ефект був зумовлений тим, що катіони натрію є активатором перших ферментів окиснення *n*-гексадекану у штаму ІМВ Ас-5017. Для *N. vaccinii* К-8 під час росту на гліцерині також було показано доцільність використання саме нітрату натрію як джерела азоту [6].

Дані, наведені у таблиці, також свідчать, що наявність у середовищі з гліцерином та солями 0,3 % метанолу або етанолу не тільки не пригнічує ріст бактерій, а й супроводжується підвищенням показників синтезу ПАР на 11–77 % у порівнянні з контролем, а отже, за таких умов вищезгадані спирти відіграють роль вторинного джерела вуглецю і споживаються клітинами. Такі результати можна пояснити встановленою нами широкою субстратною специфічністю нітритрозо-N,N-диметиланілін (НДМА) - залежних алкогольдегідрогеназ *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [7].

**Висновки.** Таким чином, запропонований спосіб утилізації технічного гліцерину дозволить підвищити рентабельність виробництва біодизелю шляхом його біоконверсії у практично цінні мікробні поверхнево-активні речовини.

**Щира подяка висловлюється науковому керівнику д.б.н., проф. Пирог Т.П.**

### Література.

1. Dellomonaco C., Fava F., Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology // *Microb. Cell. Fact.* – 2010. – V. 9. – P. 3–11.
2. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – V.27, № 1. – P. 30–39.
3. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2007. – V.18, №3. – P. 213–219.
4. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2004. – V.40, №5. – P. 470–475.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долошенко Є.Ю. Роль фосфоенолпіру-ваткарбоксілази у синтезі поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // *Мікробіол. журнал.* -2011.- Т. 73, № 4. —С. 9–15.
6. Пирог Т.П., Гриценко Н.А, Хомяк Д.И, Конон А.Д. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при конверсии отходов производства биодизеля // *Микробиол. журнал.* – 2012. – Т.74, № 1. – С. 20–27.
7. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Глицерин как субстрат для синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // *Мікробіол. журнал.* – 2012. – Т. 74, № 1. – С. 20–27.

### Авторська довідка.

1. **Мащенко Оксана Юрійвна**, студентка 4 курсу, кафедра біотехнології та мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: [maschchencooksana@gmail.com](mailto:maschchencooksana@gmail.com)
2. **Шулякова Марія Олександрівна**, магістрант, кафедра біотехнології та мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: [mariejavier@rambler.ru](mailto:mariejavier@rambler.ru)
3. **Хом'як Данило Ігорович**, магістрант, кафедра біотехнології та мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: [khomdan@ukr.net](mailto:khomdan@ukr.net)