

Морозова А.П., аспірант кафедри біотехнології мікробного синтезу, –
Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна
Гриценко Н.А., аспірант кафедри біотехнології мікробного синтезу, –
Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна
Пирог Т.П., д.б.н., – Національний університет харчових технологій м. Київ,
Україна

ВІДХОДИ ПРОМИСЛОВИХ ВИРОБНИЦТВ ЯК СУБСТРАТИ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* K-8 ТА *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* EK-1

АНОТАЦІЯ

*Встановлено можливість використання дешевої промислової сировини: гліцерину - побічного продукту виробництва біодизелю з рослинних олій і тваринних жирів, відходів харчової промисловості - олієжирових і цукрового виробництв, а також олієвмісних відходів закладів громадського харчування як ростових субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин штамами *Nocardia vaccinii* K-8 та *Rhodococcus erythropolis* EK-1.*

Ключові слова: *відходи виробництв, утилізація відходів, поверхнево-активні речовини, мікробний синтез*

*The ability of use of cheap industrial raw materials as substrates for biosurfactants synthesis by *Nocardia vaccinii* K-8 and *Rhodococcus erythropolis* EK-1 is shown in this work. Among such substrates are: glycerol – a byproduct of biodiesel production from vegetable oils and animals' fats, a food industry wastes – oil and sugar industries and oil-containing wastes from institutions of social nutrition.*

Keywords: *industrial wastes, waste utilization, biosurfactants, microbial synthesis*

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 [5].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні до теперішнього часу не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [5–7].

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі: використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості); оптимізація умов культивування продуцента та пошук нових рентабельних методів виділення та очищення ПАР; підвищення виходу цільового продукту. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими у біотехнології мікробних поверхнево-активних речовин.

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [8] і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на різних гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) і гідрофільних субстратах (глюкоза, етанол) [9].

Мета даної роботи – дослідити можливість використання відходів промислових виробництв як ростових субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин штамми *N. vaccinii* К-8, *R. erythropolis* ЕК-1.

Матеріали і методи

Культивування бактерій здійснювали на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): середовище 1 - NaNO_3 – 1,3; NaCl – 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, рН 6,8–7,0; середовище 2 - NaNO_3 – 1,0; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовували гліцерин (0,5–2,0 %), відходи оліє-жирових виробництв (0,5 %), використану (пересмажену) соняшникову олію (0,5 %), мелясу (0,5 % за вуглеводами), гексадекан (2,0 %) і рідкі парафіни (1,0 %).

Як посівний матеріал використовували добову культури, вирощені на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культури з експоненційної фази росту (48–72 год культивування), вирощені на рідкому мінеральному середовищі наведеного складу з відповідними джерелами вуглецю. Кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 120–168 год.

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху масу клітин за калібрувальним графіком.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками.

1) поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, який вимірювали за допомогою платинової і скляної пластинки за методом Вільгельмі;

2) для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини у точці зниження поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається у безрозмірних одиницях;

3) індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини, визначали за методом: до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл соняшникової олії і інтенсивно перемішували впродовж 2 хв. Індекс емульгування визначали через 24 год як відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини у пробірці.

Відходи виробництва біодизелю як субстрати для синтезу поверхнево-активних речовин

Гліцерин – триатомний спирт, який є побічним продуктом технології біодизелю і утворюється у великих кількостях при виробництві з рослинної і тваринної сировини. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [10]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на теперішній час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі. В останні роки в науковій літературі з'являється все більше публікацій, які стосуються використання гліцерину як субстрату для біотехнологічних виробництв, що в перспективі може вирішити проблему його утилізації. Одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах. В літературі є згадки про синтез поверхнево-активних речовин мікроорганізмами при рості на гліцерині. Так встановлено можливість одержання ПАР *Pseudomonas aeruginosa* MTCC8165, *P. aeruginosa* MTCC7815, *P. aeruginosa* MTCC7812, *P. aeruginosa* MTCC7814, дріжджів роду *Pseudozyma* при культивуванні на цьому субстрат [11].

Показники синтезу ПАР досліджуваними штамми бактерій під час культивування на середовищі з гліцерином наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* К-8, *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з гліцерином (0,5 %)

Штам-продуцент	Показники синтезу ПАР	
	ПАР*	E_{24} , %
<i>N. vaccinii</i> К-8	1,8±0,09	60±3,0
<i>R. erythropolis</i> ЕК-1	3,3±0,16	50±2,5

Примітка: Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснювали на середовищі 1, *N. vaccinii* К-8 – на середовищі 2.

Найнижчі показники синтезу ПАР за використання гліцерину як ростового субстрату спостерігали для штаму *N. vaccinii* К-8. Тому наші подальші дослідження були спрямовані на визначення умов культивування цього штаму бактерій, що забезпечують підвищення синтезу ПАР. Встановлено, що внесення у середовище з гліцерином сульфату заліза, мікроелементів і дріжджового автолізу (окремо чи в різних можливих комбінаціях) супроводжувалось підвищенням або синтезу ПАР, або біомаси, або цих обох досліджуваних показників (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив мікроелементів і дріжджового автолізу на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 у процесі росту на гліцерині (0,5 %)

Наявність у середовищі			ПАР*	Біомаса, г/л
FeSO ₄ ×7H ₂ O	мікроелементів	дріжджового автолізу		
–	–	–	1,8±0,09	0,25±0,01
–	–	+	3,0±0,15	1,1±0,05
–	+	–	2,9±0,14	0,5±0,02
+	–	–	0,9±0,04	1,2±0,06
–	+	+	1,7±0,08	0,85±0,04
+	–	+	4,2±0,20	2,0±0,10
+	+	–	2,6±0,13	1,7±0,08
+	+	+	4,2±0,20	2,2±0,11

Примітка: Культивування *N. vaccinii* К-8 здійснювали на середовищі 2.

Так, наприклад, за наявності іонів заліза рівень біомаси підвищувався у 5–9 разів (до 1,2–2,2 г/л), а за присутності дріжджового автолізу – у 3,5–9 разів. У той же час не помічено позитивного впливу заліза на синтез ПАР: за внесення у середовище сульфату заліза показник умовної концентрації ПАР знижувався з 1,8 до 0,9 (на фоні підвищення біомаси). Наявність мікроелементів у середовищі культивування стимулювала утворення ПАР, але не біомаси: умовна концентрація ПАР збільшувалася до 2,9, а концентрація біомаси підвищувалася з 0,25 до 0,5 г/л.

Найвищі показники умовної концентрації ПАР (4,2) і найбільший рівень біомаси (2,0–2,2 г/л) спостерігалися за одночасної наявності у середовищі культивування іонів заліза і дріжджового автолізу, а також іонів заліза, мікроелементів і дріжджового автолізу. Цікаво зазначити, що за внесення у середовище тільки мікроелементів і дріжджового автолізу показник ПАР* і концентрація біомаси збільшувались незначно (до 1,7 і 0,85 г/л відповідно). Можна припустити, що необхідний для синтезу ПАР мікроелемент міститься також і у дріжджовому автолізаті, і сумарна концентрація цього мікроелементу, що досягається у середовищі за

одночасного внесення як дріжджового автолізу, так і розчину мікроелементів стає вищою за оптимальну, що й призводить до зниження синтезу ПАР.

Наступні експерименти показали, що за підвищення концентрації гліцерину до 1,0-2,0 % спостерігали збільшення показників синтезу ПАР. Так, за таких умов культивування умовна концентарція поверхнево-активних речовин досягала 6–8, а індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини – 100 %.

Синтез поверхнево-активних речовин на відходах харчових виробництв

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів поживного середовища становить близько 20–30 % загальних витрат на виробництво. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (оліє-жирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини) [7].

Враховуючи хімічний склад ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 (комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів), а також можливість підвищення ефективності синтезу мікробних метаболітів за присутності екзогенних попередників (жирних кислот), ми припустили, що потенційним дешевим субстратом для вирощування штаму ЕК-1 можуть бути відходи виробництва рослинних олій, що містять у своєму складі жирні кислоти, тригліцериди, фосфатиди (табл. 3). У табл. 3 наведено дані про синтез ПАР за умов росту штаму ЕК-1 на середовищі з пересмаженою соняшниковою олією (після використання для смаження у закладах громадського харчування), а також за використання як субстрату меляси – відходу цукрового виробництва.

Таблиця 3

Утворення поверхнево-активних речовин у процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на відходах харчових виробництв

Субстрат	Показники синтезу ПАР	
	ПАР*	E ₂₄ , %
Відходи оліє-жирових виробництв, 0,5 %	5,2±0,26	75±3,7
Використана (пересмажена) соняшникова олія, 0,5 %	4,8±0,24	65±3,2
Меляса, 0,5 % (за вуглеводами)	3,3±0,16	40±2,0
Гексадекан, 2,0 % (контроль)	4,8±0,24	70±3,5
Рідкі парафіни, 1,0 % (контроль)	5,9±0,29	80±4,0

Примітка: Культивування *R. erythropolis* EK-1 здійснювали на середовищі 1

Як видно з наведених у табл. 3 даних, показники синтезу ПАР на середовищах, що містять як джерело вуглецю і енергії відходи оліє-жирових виробництв і використану соняшникову олію, практично не відрізняються від таких, одержаних за використання як субстрату гексадекану і рідких парафінів. Проте слід зазначити, що концентрація гексадекану і рідких парафінів була у 2–4 рази вища, ніж олієвмісних субстратів. Крім того, для підвищення синтезу ПАР на відходах виробництв може бути використано ряд підходів, таких як встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів; внесення у середовище культивування попередників біосинтезу; використання суміші ростових і неростових субстратів; виявлення „вузьких” місць метаболізму й розробка підходів до їхнього усунення.

Висновки

Отже, у результаті проведених досліджень встановлено можливість використання гліцерину – побічного продукту виробництва біодизелю, а також відходів харчових виробництв (оліє-жирової, цукрової промисловості) як субстратів для одержання мікробних поверхнево-активних речовин.

Використана література

1. *Cameotra S.S., Makkar R.S.* Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules // *Curr.Opin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 7, № 3. – P. 262–266.
2. *Singh P., Cameotra. S.S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // *Trends Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 142–146.
3. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 609–618.
4. *Ron E.Z., Rosenberg E.* Natural roles of biosurfactants // *Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 3, № 4. – P.229–236.
5. *Desai J.D., Banat I.M.* Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – Vol. 61, № 1. – P. 47–64.
6. *Banat I.M, Makkar R.S., Cameotra S.S.* Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53, № 5. – P. 495–508.
7. *Mukherjee S., Das P., Sen R.* Towards commercial production of microbial surfactants // *Trends in Biotechnology.* – 2006. – Vol. 24, № 11 – P. 354–359.
8. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н.* Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 58–63.

9. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5 . – С. 544– 550.
10. Yazdani S.S., Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – Vol. 18. – P. 213–219.
11. da Silva G.P. Mack M. Contiero G. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – V. 27. – P. P. 30 - 39.