

М.О. Шулякова¹, Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук²

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@rambler.ru, tapirog@nuft.edu.ua

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ДЕЯКІ ЗАКОНОМІРНОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017 НА СУМІШІ РОСТОВИХ СУБСТРАТІВ

Досліджено можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. Показано, що за умов росту даного штаму на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (етанол, гліцерин) субстратів показники синтезу ПАР були у 1,5–2 рази вищими, ніж на відповідних монособстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 від способу підготовки інокуляту у концентрації монособстратів у суміші. Одержані дані є основою для розробки технології отримання ПАР культивуванням *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, змішані ростові субстрати, культивування, біосинтез.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено можливість інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші субстратів [5], а також метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитних гліцерину, глюкози, етанолу [4]. У ході досліджень було показано залежність ефективності біосинтезу ПАР від природи джерела карбону в середовищі для одержання інокуляту та концентрації субстратів у суміші [4].

Дотепер у літературі є небагато повідомлень про використання змішаних субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин [7–9]. Слід зазначити, що у цих роботах досліджували власне не культивування продуцентів на суміші субстратів, а ефект від внесення вторинного джерела карбону у середовище для інтенсифікації процесів біосинтезу

ПАР [7–9]. Так, у разі внесення додаткового гідрофобного субстрату (олеїнова кислота) у процесі вирощування продуцентів софороліпідів *Candida bombicola* на середовищі з глюкозою спостерігали підвищення синтезу цих поверхнево-активних гліколіпідів до 33 г/л [9]. Додавання 1% оливкової олії під час культивування *Brevibacterium aureum* MSA13 на мелясі супроводжувалося збільшенням показників утворення бревіфактину на 33–47% порівняно з культивуванням штаму на середовищі без олії [8], а вирощування *Candida lipolytica* UCP0988 на суміші олії канולי (10%) та глюкози (10%) дало змогу підвищити концентрацію синтезованих софороліпідів до 8 г/л [7].

Штам *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує поверхнево-активні речовини за умов росту на гідрофільних (етанол, глюкоза) і гідрофобних (гексадекан) субстратах [2]. Синтезовані ПАР є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів, а гліколіпіди представлені трегалозоміколатами [2].

Оптимізація умов культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 дала змогу підвищити показники синтезу ПАР у три рази [2], а дослідження особливостей метаболізму *R. erythropolis* IMB Ac-5017 [3] — класифікувати етанол як енергетично дефіцитний субстрат. Згідно енергетичної класифікації субстратів Бабеля [6] гексадекан є енергетично надлишковим, а гліцерин — енергетично дефіцитним субстратами.

Отже, метою даної роботи було дослідження можливості використання суміші енергетично нерівноцінних субстратів (етанол + гліцерин, гексадекан + гліцерин, гексадекан + етанол) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Матеріали і методи

Об'єкт досліджень — штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за номером IMB Ac-5017.

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3; NaCl — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; рН 6,8–7,0.

Як джерело карбону та енергії використовували моносубстрати (% об'ємна частка): гліцерин — 0,94–2,05; *n*-гексадекан — 0,92–1,98; етанол — 1,1–2,2; а також суміш *n*-гексадекану і гліцерину, *n*-гексадекану і етанолу, етанолу і гліцерину в концентрації 0,5–1,0. Моно- і змішані субстрати, які використані для культивування, були еквімолярні за карбоном.

Посівним матеріалом була культура *R. erythropolis* IMB Ac-5017 в експоненційній фазі росту, вирощена на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами карбону 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 (220 об/хв) упродовж 120 год при $+28$ °С.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками [2]:

1) поверхневий натяг (σ_s) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина);

2) для оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник «умовної концентрації ПАР» (ПАР*, безрозмірні одиниці). Цей показник визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР;

3) індекс емульгування (E_{24} , %). Для визначення емульгувальної здатності до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл субстрату для емульгування та струшували упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Усі досліди проводили у 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у праці [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На першому етапі досліджували вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР під час росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів (табл. 1). Як основні критерії для оцінки синтезу ПАР використовували показник умовної концентрації ПАР* та індекс емульгування E_{24} , % (див. Матеріали і методи), оскільки відомо, що більшість мікроорганізмів одночасно синтезують метаболіти як з поверхнево-активними, так і емульгувальними властивостями, комплекс яких має значний практичний потенціал. Раніше було показано, що *R. erythropolis* IMB Ac-5017 також утворює метаболіти такої комплексної дії [2].

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу ПАР на змішаних субстратах залежать від природи джерела карбону у середовищі для одержання інокуляту, однак індекс емульгування E_{24} при цьому змінювався незначно. Так, за використання посівного матеріалу, вирощеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР під час культивування досліджуваних бактерій на суміші гексадекану і гліцерину була у 1,6–1,8 рази вищою, ніж на відповідних моносубстратах. Водночас най-

вищі показники синтезу ПАР на суміші етанолу і гліцерину, гексадекану й етанолу (у 1,2–1,6 рази вищі порівняно з такими на моносубстратах) спостерігали у разі застосування інокуляту, вирощеного на відповідних змішаних субстратах (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 при рості на суміші субстратів

Table 1

Effect of inoculum preparation on the SAS synthesis of *R. erythropolis* IMB Ac-5017 during the growth on the mixture of substrates

Джерело карбону у середовищі для біосинтезу ПАР	Джерело карбону у середовищі для одержання інокуляту	Показники синтезу ПАР	
		ПАР*	E24, %
Гексадекан, 0,5% + гліцерин, 0,5%	Гексадекан, 0,5%	3,85 ± 0,19	45 ± 2
	Гліцерин, 0,5%	3,36 ± 0,17	50 ± 2
	Гексадекан, 0,25% + гліцерин, 0,25%	3,55 ± 0,18	51 ± 2
Гексадекан, 0,99%	Гексадекан, 0,5%	3,30 ± 0,17	38 ± 2
Гліцерин, 1,02%	Гліцерин, 0,5%	2,3 ± 0,11	49 ± 2
Гліцерин, 0,5% + етанол, 0,5%	Гліцерин, 0,5%	3,10 ± 0,17	49 ± 2
	Етанол, 0,5%	3,30 ± 0,16	51 ± 2
	Гліцерин, 0,25% + етанол, 0,25%	3,40 ± 0,17	51 ± 2
Гліцерин, 0,94%	Гліцерин, 0,5%	2,10 ± 0,11	49 ± 2
Етанол, 1,1%	Етанол, 0,5%	2,80 ± 0,14	48 ± 2
Гексадекан, 0,5% + етанол, 0,5%	Гексадекан, 0,5%	3,57 ± 0,18	44 ± 2
	Етанол, 0,5%	3,50 ± 0,17	46 ± 2
	Гексадекан, 0,25% + етанол, 0,25%	3,60 ± 0,18	47 ± 2
Гексадекан, 0,92%	Гексадекан, 0,5%	3,10 ± 0,16	32 ± 2
Етанол, 1,1%	Етанол, 0,5%	2,80 ± 0,14	43 ± 2



Відомо, що за використання двох енергетично дефіцитних субстратів ефект «допоміжного» субстрату може мати місце, лише якщо вони асимілюються одночасно [5]. Так, на відміну від комбінації гліцерину з етанолом, за використання суміші гліцерину та глюкози стимулювального ефекту на синтез поверхнево-активних речовин не спостерігали: показник ПАР* для усіх варіантів із сумішню субстратів був нижчий, ніж на моносубстраті — глюкозі (дані не наведено).

Загалом значення умовної концентрації поверхнево-активних речовин та індексу емульгування, одержані за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на змішаних субстратах, свідчать про більш повне перетворення карбону обох субстратів саме у цільовий продукт.

Наступним етапом роботи було дослідження залежності синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від концентрації моносубстратів у суміші (табл. 2). У цих експериментах використовували інокулят, вирощений на середовищі зі встановленим оптимальним джерелом карбону (див. табл. 1). Використання вищих концентрацій субстратів у суміші також приводило до збільшення у 1,1–1,7 рази умовної концентрації ПАР порівняно з вирощуванням *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на відповідних моносубстратах (табл. 2). Проте підвищення концентрацій моносубстратів у суміші практично не впливала на значення індексу емульгування культуральної рідини (табл. 1–2).

Таблиця 2

Синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на сумішах гексадекану (1%), гліцерину (1%) і етанолу (1%)

Table 2

SAS synthesis of *R. erythropolis* IMB Ac-5017 on the mixtures of hexadecane (1%), glycerol (1%) and ethanol (1%)

Субстрат	Показники синтезу ПАР	
	ПАР*	E24, %
Гексадекан + гліцерин	4,20±0,21	53±2
Гексадекан, 1,98%	3,63±0,18	47±2
Гліцерин, 2,05%	2,45±0,12	49±2
Гліцерин + етанол	4,35±0,22	59±2
Гліцерин, 1,87%	2,40±0,12	49±2
Етанол, 2,2%	3,25±0,16	46±2
Гексадекан + етанол	4,55±0,23	48±2
Гексадекан, 1,84%	3,53±0,16	44±2
Етанол, 2,2%	3,25±0,16	46±2



У табл. 3 наведено підсумкові дані щодо відносного збільшення (порівняно з моносубстратами) показників синтезу ПАР у процесі культивування бактерій на змішаних субстратах різної концентрації. Показник ПАР* за використання вищих (по 1%) концентрацій усіх досліджуваних моносубстратів у суміші виявився на 4–21% більшим, ніж у процесі культивування бактерій на змішаних субстратах нижчої концентрації (по 0,5% моносубстратів у суміші).

Аналіз даних таблиць 1–3, свідчить про відсутність чіткої кореляції між відсноною зміною показників синтезу ПАР на змішаних і відповідних моносубстратах різних концентрацій. Так, наприклад, у процесі культивування штаму ІМВ Ас-5017 на суміші гексадекану (0,5%) і гліцерину (0,5%) значення показника ПАР* становило 117% від такого на моносубстраті гексадекані, а за підвищення концентрацій субстратів у суміші до 1,0% дещо зменшилося (до 110%, табл. 3). При цьому абсолютне значення ПАР* збільшувалося за підвищення концентрацій гексадекану і гліцерину у змішаному субстраті і становило 3,85 і 4,0 відповідно. Аналогічна ситуація і з індексом емульгування E_{24} для деяких випадків (наприклад, суміші гексадекану та гліцерину).

Таблиця 3

Показники синтезу ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на моно- і змішаних субстратах

Table 3

SAS synthesis indexes of *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 under the growth on mono- and mixed substrates

Концентрація моносубстратів у суміші, %	Концентрація моно-субстрату, % (контроль)	ПАР*, % від контролю	E ₂₄ , % від контролю
Гексадекан, 0,5 + гліцерин, 0,5	Гексадекан, 0,99	117±6	118±5
	Гліцерин, 1,02	167±8	92±5
Гексадекан, 1,0 + гліцерин, 1,0	Гексадекан, 1,98	110±6	113±6
	Гліцерин, 2,04	171±9	108±5
Гліцерин, 0,5 + етанол, 0,5	Гліцерин, 0,89	160±8	104±5
	Етанол, 1,14	121±6	106±5
Гліцерин, 1,0 + етанол, 1,0	Гліцерин, 1,78	181±9	120±6
	Етанол, 2,28	134±7	128±6
Гексадекан, 0,5 + етанол, 0,5	Гексадекан, 0,92	116±6	147±7
	Етанол, 1,1	129±6	109±5
Гексадекан, 1,0 + етанол, 1,0	Гексадекан, 1,84	129±6	109±5
	Етанол, 2,2	140±7	104±5



Отримані результати свідчать про необхідність проведення подальших досліджень зі встановлення оптимальних умов синтезу поверхнево-активних речовин на суміші енергетично нерівноцінних субстратів. При цьому слід враховувати кілька моментів. По-перше, можливе інгібування росту і синтезу ПАР високими концентраціями субстратів. По-друге, необхідно визначити оптимальне для синтезу ПАР молярне співвідношення субстратів у суміші, що потребує встановлення шляхів метаболізму відповідних субстратів та здійснення попередніх теоретичних розрахунків енергетичних потреб цього процесу. По-третє, за зміни концентрацій моносубстратів у суміші у середовищі змінюється співвідношення карбон/нітроген, що значно впливає на процес утворення ПАР.

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів (гексадекан + гліцерин, гліцерин + етанол, гексадекан + етанол) показники синтезу поверхнево-активних речовин підвищуються у 1,5–2 рази порівняно з культивуванням бактерій на відповідних моносубстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР на суміші ростових субстратів від природи джерела карбону у середовищі для одержання інокуляту і концентрації субстратів у суміші.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
2. 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 // Прикл. биохим. и микробиол. — 2004. — 40, № 5. — С. 544–550.
3. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C_2 -метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. — 2008. — 77, № 6. — С. 749–757.
4. Пирог Т.П., Щербина А.В., Билец И.В. Интенсификация синтеза биосурфактантов *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Международная научн. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, Беларусь, 31 мая — 4 июня 2010 г.): тез. докл. — Минск, 2010 г. — С. 146–148.
5. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: «Наукова думка», 2010. — 327 с.
6. Babel W., Moller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. — 1985. — 131, № 1. — P. 39–45.
7. Sarubbo L.A., Farias C.B., Campos-Takaki G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica* // Curr. Microbiol. — 2007. — 54, № 1.— P. 68–73.



8. 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.

9. Van Bogaert I.N., Saerens K., De Muynck C., Develter D., Soetaert W., Vandamme E.J. Microbial production and application of sophorolipids // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — 76, № 1. — P. 23—34.

УДК 759.873.088.5:661.185

М.А. Шулякова¹, Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук²

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина,

тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@ Rambler.ru, tapirog@nuft.edu.ua

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ,
ул. Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ИМВ АС-5017 НА СМЕСИ РОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ

Реферат

Исследована возможность использования смеси ростовых субстратов (гексадекан, глицерин, этанол) для интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017. Показано, что при росте данного штамма на смеси энергетически избыточного (гексадекан) и энергетически дефицитных (этанол, глицерин) субстратов показатели синтеза ПАВ были в 1,5–2 раза выше, чем на соответствующих моносубстратах. Установлена зависимость синтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 от способа подготовки инокулята и концентрации моносубстратов в смеси. Полученные данные являются основой для разработки технологии получения ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, смешанные ростовые субстраты, культивирование, биосинтез.



UDK 759.873.088.5:661.185

M.O. Shulyakova¹, T.P. Pirog^{1,2}, T.A. Shevchuk²

¹National University of Food Technologies,

68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,

tel.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@rambler.ru, tapirog@nuft.edu.ua

²D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154,

Academ. Zabolotny str., Kyiv GSP, D03143, Ukraine,

**SOME REGULARITIES OF SURFACTANTS SYNTHESIS
UNDER CULTIVATION OF *RHODOCOCCUS
ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017 ON THE MIXTURES
OF GROWTH SUBSTRATES**

Summary

It was investigated the possibility of using the mixture of growth substrates (hexadecane, glycerol, ethanol) to intensify the synthesis of surface-active substances (SAS) of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. It was shown that under conditions of growth of this particular strain on the mixture of energy excess (hexadecane) and energy deficient (ethanol, glycerol) substrates SAS synthesis rates increased in 1.5–2 fold as compared with bacteria growth on the corresponding monosubstrates. It was ascertained the dependence of SAS synthesis of *R. erythropolis* IMB Ac-5017 on the method of inoculum preparation and concentration of monosubstrates in the mixture. The data obtained are the basis for the development of technology of production of the SAS by cultivation of strain IMB Ac-5017 on the mixture of energy unequal growth substrates.

Key words: surfactants, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, mixed growth substrates, cultivation, biosynthesis.

Одержано 28.02.2012.

