

Морозова, А. П. Альтернативні джерела вуглецю для синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / А. П. Морозова, М. Д. Кундєєв, Т. П. Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2011. – № 37-38. – С.77–81.

УДК 759.873.088.5:661.185

Морозова А. П., аспірант
Кундєєв М. Д., студент
Пирог Т. П., доктор біол. наук
A. Morozova, M. Kunderiev, T. Pirog

**АЛЬТЕРНАТИВНІ ДЖЕРЕЛА ВУГЛЕЦЮ ДЛЯ СИНТЕЗУ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS*
ERYTHROPOLIS ЕК-1**

**ALTERNATIVE CARBON SOURCES FOR SYNTHESIS OF
RHODOCOCCLUS *ERYTHROPOLIS* ЕК-1 SURFACE ACTIVE
SUBSTANCES**

*Показано можливість використання продуктів переробки основної сировини і відходів різних галузей промисловості (меляса, рідкі парафіни, гліцерин, відходи оліє-жирових виробництв, пересмажена олія) як дешевих субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Найвищі показники синтезу ПАР (умовна концентрація 10,0–21,3) спостерігались за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на олієвмісних ростових субстратах.*

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, біосинтез, відходи виробництв, олієвмісні субстрати.*

*The possibility to use products of processing of main raw materials and wastes of different industries (molasses, liquid paraffin, glycerol, oil industry wastes and used (fried) oil) as cheap substrates for synthesis of *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 surface active substances (SAS) was shown. The highest indexes of SAS synthesis (conditional SAS concentration 10.0-*

21.3) were determined when *R. erythropolis* EK-1 was grown on oil-containing substances.

Key words: surface active substances, biosynthesis, industrial wastes, oil-containing substrates.

Унікальні властивості мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) забезпечили їхнє використання у різних галузях промисловості замість хімічно синтезованих аналогів. ПАР мікробного походження застосовують у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості, сільському господарстві і для очищення навколишнього середовища від вуглеводнів і важких металів [6, 7]. Доцільність практичного використання ПАР мікробного походження залежить передусім від економічної ефективності їхнього виробництва. Одним із способів здешевлення технологій мікробних ПАР є використання дешевих ростових субстратів, наприклад відходів інших виробництв [3, 5].

Щорічно у світі виробляються мільйони тон різних шкідливих і нешкідливих відходів. Витрати на їхню переробку та знешкодження займають значне місце у бюджеті підприємств. Проте раціональний підхід до утилізації відходів передбачає їхнє повторне використання та переробку. Одним з ефективних шляхів утилізації промислових відходів є використання їх як джерел вуглецю для процесів мікробного синтезу. Основні дослідження потенційних промислових субстратів для мікробних біотехнологій зосередилися у сфері переробки відходів сільськогосподарських культур, таких як соя, цукровий буряк, картопля, солома та висівки пшениці і рису, лушпиння сої, зернових та рису, відходи переробки фруктів, виробництва кави, олій та ін. [4].

На теперішній час одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин – побічний продукт, утворюваний у великих кількостях при виробництві біодизелю з

рослинної і тваринної сировини [8]. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [8]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на теперішній час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі.

Мета даної роботи – дослідження можливості використання відходів різних виробництв як дешевих ростових субстратів для синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* EK-1.

Штам *R. erythropolis* EK-1 ізольовано із забруднених нафтою зразків ґрунту [1] і депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером Ас-5017.

Культивування штаму EK-1 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 1,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001%; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували: відходи оліє-жирових виробництв, використану (пересмажену) соняшникову олію, мелясу, гліцерин, рідкі парафіни і гексадекан (контроль) у концентрації 0,5; 1 та 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агаризованому середовищі (ГКА) і культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 1 % відповідного джерела вуглецю. Кількість інокуляту – 5% від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °С упродовж 168 год.

Поверхневий натяг (σ_s) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина). Принцип його роботи базується на визначенні сили втягування платинової пластинки, що зумовлена поверхневим натягом рідини. Для оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник

«умовної концентрації ПАР» (ПАР*). Цей показник визначали як ступінь розведення 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.

У разі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на субстратах, що можуть знижувати поверхневий натяг (гексадекан, рідкі парафіни, олія та відходи її виробництва) перед вимірюванням цього показника культуральну рідину звільняли від залишкового субстрату обробкою гексаном (якщо штам вирощували на середовищі з гексадеканом або рідкими парафінами) чи бензином (якщо культивування штаму здійснювали на олієвмісних середовищах).

Емульгвальну здатність (індекс емульгування) культуральної рідини визначали так. До 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл субстрату 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 відсотках. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Враховуючи хімічний склад ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 (комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів) [1], а також можливість інтенсифікації синтезу цих мікробних метаболітів за присутності екзогенних попередників (жирних кислот) [5], ми припустили, що потенційними ефективними і дешевими джерелами вуглецю для *R. erythropolis* ЕК-1 можуть бути насамперед олієвмісні субстрати – відходи виробництва рослинних олій, що містять у своєму складі жирні кислоти, тригліцериди, фосфатиди, а також пересмажена олія (після використання для смаження у закладах громадського харчування).

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на відходах різних виробництв.

Таблиця 1

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

Субстрат	Концентрація субстрату, %	Показники синтезу ПАР		
		pH _{кінцеве}	E ₂₄ , %	ПАР*
Відходи оліє-жирових виробництв	0,5	7,9±0,2	36,8±1,1	4,8±0,14
	1,0	7,9±0,2	40,0±1,2	10,0±0,3
Використана (пересмажена) соняшникова олія	0,5	8,5±0,3	20,0±0,6	2,0±0,06
	1,0	7,7±0,2	65,0±1,9	4,8±0,14
Меляса	0,5	8,9±0,3	37,0±1,1	2,0±0,06
	1,0	9,0±0,3	40,0±1,2	3,3±0,09
Гліцерин	0,5	7,0±0,2	37,0±1,1	2,1±0,06
	1,0	7,1±0,2	47,3±1,4	3,2±0,09
Рідкі парафіни	0,5	7,0±0,2	39,0±1,1	4,7±0,14
	1,0	7,1±0,2	47,0±1,4	4,6±0,14
Гексадекан (контроль)	2,0	7,0±0,2	70,0±2,1	4,8±0,14

П р и м і т к а . Посівний матеріал вирощений на ГКА.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, найвищі показники синтезу ПАР (ПАР* 10,0) спостерігались у процесі культивування штаму ЕК-1 на середовищі, що містило як джерело вуглецю відходи оліє-жирових виробництв у концентрації 1 %. Разом з тим, умовна концентрація ПАР у разі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з 1 % пересмаженої соняшникової олії (ПАР* 4,8) практично не відрізнялася від

такої за використання як субстрату гексадекану і рідких парафінів (ПАР* 4,6–4,8).

У подальших дослідженнях як субстрат для вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 використовували пересмажену олію, оскільки вона у великій кількості накопичується у різних закладах громадського харчування.

На наступному етапі було проведено порівняння ефективності застосування пересмаженої та звичайної соняшникової олії для синтезу ПАР штамом ЕК-1. Результати наведено у табл. 2.

Таблиця 2

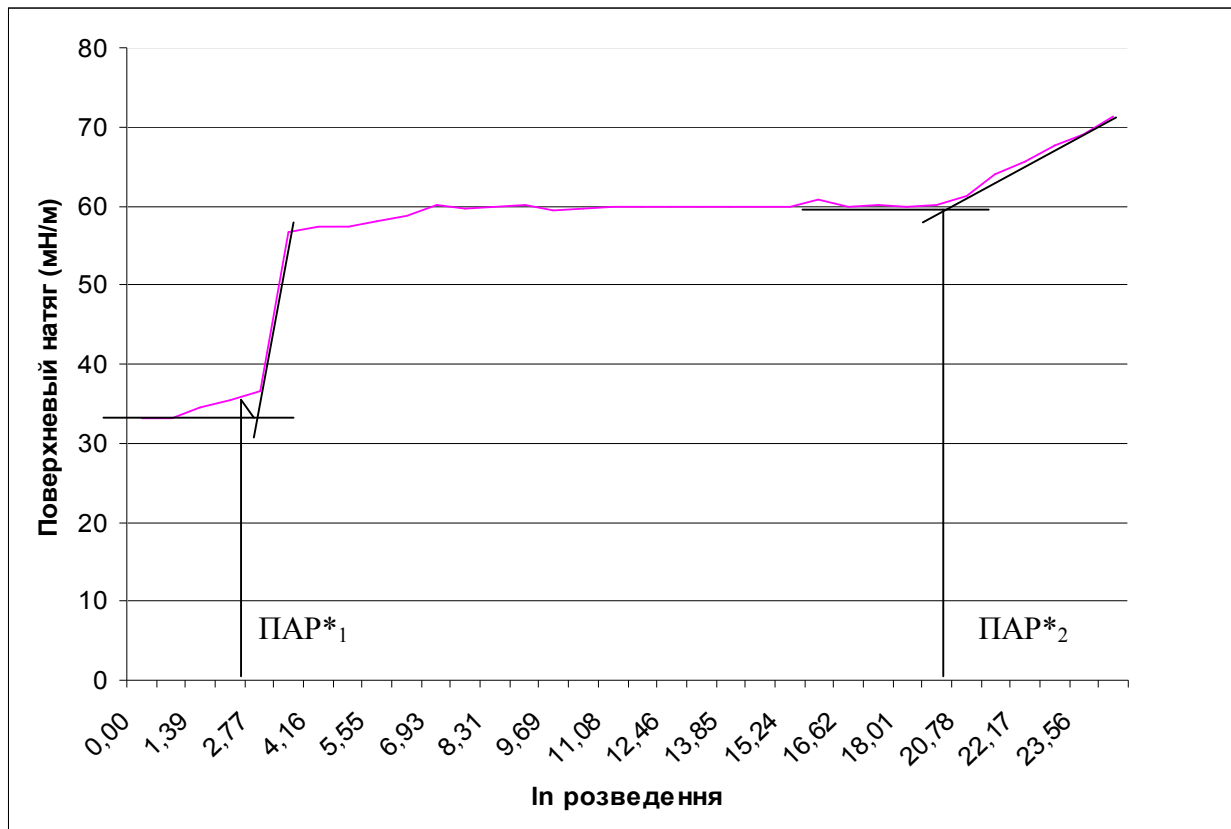
Синтез поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 за використання як субстрату пересмаженої та звичайної олії

Субстрат	Концентрація субстрату, %	Показники синтезу ПАР			
		pH _{кінцеве}	E ₂₄ , %	ПАР* ₁	ПАР* ₂
Пересмажена олія	1,0	7,0±0,2	37,0±0,2	1,5±0,1	19,2±0,2
	2,0	8,0±0,3	49,0±0,3	2,7±0,2	21,3±0,2
Звичайна олія	1,0	7,0±0,2	50,0±0,1	–	18,2±0,1
	2,0	7,2±0,2	49,6±0,2	–	19,2±0,1

П р и м і т к а. ПАР*₁ і ПАР*₂ – умовна концентрація ПАР, розрахована для двох точок збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від логарифму розведення (див. рисунок); «–» – показник відсутній. Посівний матеріал вирощений на рідкому середовищі з 1 % відповідних субстратів до середини експоненційної фази росту (48 год).

На рисунку наведено графік залежності величини поверхневого натягу від логарифму розведення вільної від клітин та залишків субстрату культуральної рідини після вирощування штаму ЕК-1 на

середовищі, що містило 2 % пересмаженої олії. Цей графік характеризується наявністю двох точок



Залежність поверхневого натягу від догарифму розведення супернатанту культуральної рідини після вирощування *R. erythropolis* EK-1 на пересмаженій олії (2 %)

збільшення поверхневого натягу – за логарифму розведення 2,7 і 21,3 відповідно. Слід зазначити, що такий характер залежності величини σ_s від логарифму розведення супернатанту культуральної рідини *R. erythropolis* EK-1 є нетиповим як для ПАР даного штаму, так і для інших мікробних поверхнево-активних речовин. На нашу думку, це явище можна пояснити так.

Оскільки *R. erythropolis* EK-1 синтезує комплекс поверхнево-активних речовин [1], то цілком ймовірно, що за умов росту на різних за

хімічною природою вуглецевих субстратах синтезуються різні поверхнево-активні речовини, і/або змінюється співвідношення між певними компонентами комплексу. Можна припустити, що у процесі вирощування штаму ЕК-1 на олієвмісних субстратах у складі утворюваних ПАР будуть переважати жирні кислоти та їхні ефіри (наприклад характерні для *R. erythropolis* ЕК-1 та інших представників роду *Rhodococcus* міколові кислоти), так як у середовищі містяться майже готові блоки, необхідні для їхнього синтезу, і немає потреби у складних перетвореннях ростового субстрату на поверхнево-активні речовини іншої хімічної природи (гліко- та фосфоліпіди). Якщо наше припущення вірне, то, очевидно, що вищий показник ПАР*2 (див. табл. 2) відповідає умовній концентрації поверхнево-активних речовин, які за хімічною природою є жирними кислотами та їхніми похідними, а нижче значення ПАР*1 – умовній концентрації ПАР гліко- і фосфоліпідної природи.

Разом з тим слід зазначити, що графік залежності величини поверхневого натягу від логарифму розведення супернатанту культуральної рідини після культивування штаму ЕК-1 на звичайній олії (на відміну від пересмаженої) виявився типовим для ПАР і містив лише одну точку різкого збільшення показника σ_s , що відповідає умовній концентрації ПАР 18,2–19,2 (див. табл. 2). Ми вважаємо, що це явище зумовлено тим, що використана олія містить залишки смаженої на ній їжі, які можуть використовуватися для синтезу наприклад, вуглеводної частини гліколіпідів. Для перевірки цього припущення необхідно визначити показник ПАР* за використання як ростового субстрату пересмаженої олії, звільненої від залишків смаженої їжі, а також проаналізувати хімічний склад ПАР, синтезованих за умов росту штаму ЕК-1 на різних олієвмісних середовищах, що буде предметом наших подальших досліджень. Якщо наші припущення будуть підтверджені експериментально, наступним етапом досліджень стане пошук шляхів

підвищення синтезу гліколіпідів у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на олієвмісних середовищах. Необхідність проведення таких досліджень зумовлена тим, що хоча поверхнево-активним речовинам, основними компонентами яких є жирні кислоти та їхні похідні, й притаманний високий показник ПАР*, вони характеризуються невисокою здатністю до зниження поверхневого натягу (60 мН/м, див. рисунок), у зв'язку з чим їхнє використання у промисловості не є перспективним. Одним із підходів до підвищення синтезу гліколіпідів у складі синтезованих на олієвмісній сировині ПАР, може бути внесення у таке середовище невисоких концентрацій глюкози (і/або меляси як вуглеводвмісних відходів цукрового виробництва) або С₄-дикарбонових кислот – попередників глюконеогенезу, як було показано нами раніше у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі і гексадекані [2].

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи встановлено можливість використання відходів виробництв (оліє-жирової промисловості, використаної соняшникової олії, гліцерину, меляси, рідких парафінів) для синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1. Максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин спостерігалися за умов культивування штаму ЕК-1 на відходах оліє-жирової промисловості (ПАР*=10) та пересмаженій олії (ПАР*=21,3).

С п и с о к л і т е р а т у р и

1. 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.

2. Пирог Т.П., Тарасенко Д.А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 48–55.

3. Dessai J.D., Banat I.M.. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Rev. – 1997. – Vol. 61. – P. 47-64.

4. Makkar R.S., Cameotra S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58. – P. 428-434.

5. Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N. Production of surfactants from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey // Eng. Life Sci. – 2005. – Vol. 4. – P. 357-362.

6. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13, № 3. – P. 249–252.

7. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25. – P. 99–121.

8. 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.

Надійшла до редколегії 30 листопада 2009 р.