

Пирог, Т.П. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане / Т. П. Пирог, С. В. Игнатенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С.436–442.

УДК 759.873.088.5:661.185

**МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА
ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Rhodococcus
erythropolis* ЭК-1 НА ГЕКСАДЕКАНЕ**

© 2011 г. Т. П. Пирог***, С.В. Игнатенко*

**Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601*

e-mail tapirog@usuft.kiev.ua

***Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680*

Исследованы особенности синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при периодическом культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 на среде с н-гексадеканом.

Максимальные показатели синтеза ПАВ (концентрация внеклеточных ПАВ 7.2 г/л, индекс эмульгирования культуральной жидкости 50 %, выход ПАВ от субстрата 50 %) наблюдались при концентрации растворенного кислорода 60–70 % от насыщения кислородом воздуха, рН 8.0, дробной подаче субстрата порциями по 0.3–0.4 % каждые 5–6 ч до конечной концентрации 2.4 % (по объему) и использовании 10 % инокулята, выращенного до середины экспоненциальной фазы на среде с 1.0 % (по объему) н-гексадекана.

Реализация процесса биосинтеза ПАВ на ферментационном оборудовании дала возможность повысить почти в 2 раза количество синтезированных ПАВ и сократить в 3.5 раза длительность культивирования продуцента по сравнению с выращиванием в колбах на качалке.

Из загрязненных нефтью образцов почвы нами выделен штамм нефтеокисляющих бактерий, идентифицированный как *Rhodococcus*

erythropolis ЭК-1 [1]. Установлена возможность очистки воды от нефти (100 мг/л) иммобилизованными на керамзите клетками *R. erythropolis* ЭК-1 [1] и интенсификации процесса деградации нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма ЭК-1 [2]. Показано, что при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах *R. erythropolis* ЭК-1 образует поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые по химической природе являются комплексом нейтральных и гликолипидов (трегалозомоно- и димиколаты) [3]. Изучение особенностей метаболизма н-гексадекана у штамма ЭК-1 позволило установить условия культивирования бактерий, обеспечивающих повышение синтеза ПАВ [4]. Так, снижение в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 концентрации катионов калия (ингибиторы алкангидроксилазы и НАДФ⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы), повышение содержания катионов натрия (активаторы этих ферментов) и железа, необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увеличением активности ферментов метаболизма н-гексадекана, а также повышением в 4 раза количества синтезированных ПАВ.

Показатели синтеза ПАВ на н-гексадекане, установленные для *R. erythropolis* ЭК-1, сравнимы с синтезирующей способностью родококков, описанных в литературе [5–7]. Однако по сравнению с другими представителями рода *Rhodococcus* селекционированный нами штамм имеет следующие преимущества: 1) способен синтезировать ПАВ на среде с общим содержанием солей 3.15 г/л (для других родококков – до 10 г/л); 2) не требует наличия в среде микроэлементов и дрожжевого экстракта; 3) синтезирует ПАВ с более высоким выходом от субстрата.

Необходимым этапом разработки технологии микробного синтеза является масштабирование процесса на ферментационном оборудовании. Культивирование продуцента в ферментере позволяет также исследовать влияние на биосинтез таких важных параметров, как аэрация, скорость

перемешивания, режим внесения субстрата, рН и др., что позволяет повысить эффективность технологии.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных исследованиям микробных поверхностно-активных веществ [5–7, 8–10], сведения о масштабировании технологий их биосинтеза либо об особенностях образования этих продуктов микробного синтеза при культивировании микроорганизмов-продуцентов в лабораторных биореакторах немногочисленны [5, 11–15]. Первые такие сообщения появились в конце 70-х – середине 80-х годов XX века и касались масштабирования процессов биосинтеза поверхностно-активных трегалозолипидов [16] и рамнолипидов [17, 18]. Позже сведения о культивировании в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus* – продуцентов ПАВ были обобщены в обзоре [5].

Отметим, что на сегодняшний день масштабированы многие технологии получения микробных ПАВ на различных промышленных отходах или продуктах переработки растительного сырья [11, 15, 19, 20]. Так, при культивировании *Bacillus subtilis* LB5a в 40 л ферментере на отходах производства муки из маниоки количество синтезированных липопептидов через 12 ч достигало 10 г/л [15]. Выращивание *Pseudozyma* (ранее *Candida*) *antarctica* ATCC 20509 – продуцента маннозоэритритоллипидов в биореакторе (2 л) на среде, содержащей 80 г/л соевого масла, сопровождалось синтезом 46 г/л гликолипидов [11]. Выход софоролипидов от субстрата при периодическом культивировании *Candida bombicola* ATCC 22214 на среде, содержащей кукурузную муку (100 г/л) и глюкозу (100 г/л) в ферментере (3 л) составлял 60 % [19]. Выращивание *Pseudomonas* sp. DSM 2874 в 2 л реакторе с дробным внесением субстрата (рапсовое масло) дало возможность повысить синтез рамнолипидов до 45 г/л [20].

На сегодняшний день в литературе имеются немногочисленные сведения об особенностях культивирования в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus* – продуцентов поверхностно-активных веществ. Возможно, одной из причин этого является тот факт, что ПАВ-синтезирующая способность родококков

несколько ниже, чем продуцентов других гликолипидов (рамно-, софороманнозоэритритолипиды). Кроме того, недостатком представителей рода *Rhodococcus* как продуцентов ПАВ является их медленный рост и, как следствие, высокая длительность процесса биосинтеза целевого продукта. Так, при культивировании *R. erythropolis* ATCC 4277 в течение 51 ч в ферментере объемом 1.5 л на среде с глицерином (15 г/л) количество синтезированных ПАВ составляло всего лишь 1.7 г/л [13]. При использовании в качестве источника углерода н-алканов (20 г/л) количество ПАВ, синтезируемых *R. erythropolis* DSM 43215 в биореакторе (50 л) к 36–38 ч роста, достигало 2 г/л [16], а при культивировании этого же штамма в 20 л ферментере в течение 160 ч на среде, содержащей 100 г/л н-алканов – 32 г/л [5]. Штамм *R. erythropolis* SD-74 через 240 ч культивирования в биореакторе объемом 5 л синтезировал из 80 г/л н-гексадекана до 40 г/л поверхностно-активных липидов [5]. В большинстве случаев высокая концентрация ПАВ была достигнута в результате синтеза этих соединений покоящимися или иммобилизованными клетками бактерий рода *Rhodococcus*.

Отметим, что недавно появились сообщения о быстрорастущем штамме *Rhodococcus* sp. Moj-3449, который характеризовался высокой скоростью роста (до 0.2 ч^{-1}) на средах, содержащих до 180 г/л алканов или сырой нефти [21]. Однако в данной работе нет информации о способности штамма Moj-3449 к синтезу ПАВ.

Цель работы – установление оптимальных условий синтеза поверхностно-активных веществ при периодическом культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в лабораторном ферментере АК-210.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 58–63.
2. *Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Щеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 175–179.
3. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
4. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
5. *Lang S., Philp J.C.* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 74. № 1–3. P. 59–70.
6. *Rosenberg E., Ron E.Z.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. № 2. P. 154–162.
7. *Kuyukina M.S., Ivchina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I.* // *J. Microbiol. Methods*. 2001. V. 46. № 2. P. 149–156.
8. *Mukherjee S., Das P., Sen R.* // *Trends in Biotechnology*. 2006. V. 24. № 11. P. 509–515.
9. *Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P.* // *Biotechnol. Adv.* 2007. V. 25. № 1. P. 99–121.
10. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. V. 57. № 4. P. 609–618.
11. *Adamczak M., Bednarski W.* // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. № 1. P. 313–316.
12. *Rau U., Nguyen L.A., Roeper H., Koch H., Lang S.* // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2005. V. 107. № 2. P. 373–380.
13. *Ciapina E.M., Melo W.C., Santa Anna L.M., Santos A.S., Freire D.M., Pereira J.N.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129–132. № 1–3. P. 880–886.
14. *Chen S.Y., Wei Y.H., Chang J.S.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. № 1. P. 67–74.

15. *Barros F.F.C., Ponezi A.N., Pastore G.M.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 9. P. 1071–1078.
16. *Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F.* // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 115. № 2. P. 491–503.
17. *Guerra-Santos L., Käppeli O., Fiechter A.* // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. № 2. P. 302–305.
18. *Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Käppeli O., Fiechter A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1986. V. 51. № 5. P. 985–989.
19. *Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N.* // Eng. Life Sci. 2005. V. 5, № 4. P. 357–362.
20. *Trummler, K., Effenberger F., Sylđatk C.* // Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 2003. V. 105. № 2. P. 563–571.
21. *Binazadeh M., Karimi I.A., Li Z.* // Enzyme Microbial. Technol. 2009. V. 45. № 1. P. 195–202.
22. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д.Г.Звягинцев. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
23. Процессы и аппараты пищевых производств. Лабораторный практикум / Ред. В. Н. Стабников. Киев: Вища школа, 1986. 175 с.
24. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
25. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
26. *Пирог Т.П., Корж Ю.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 180–188.
27. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
28. Культура животных клеток. Методы. / Ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
29. *Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 2–3. P. 318–324.