

Т.П.ПИРОГ^{1,*}, И.Н.ВОЛОШИНА¹, С.В.ИГНАТЕНКО¹, Р.И.ВИЛЬДАНОВА-МАРЦИШИН²

¹Национальный университет пищевых технологий, г. Киев, 01033

²Отделение физико-химии и технологии горючих ископаемых Института физической химии Национальной академии наук Украины, г. Львов, 79053

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане

Исследованы закономерности синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ), обладающих эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами, при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане. Установлены оптимальные для синтеза ПАВ условия культивирования продуцента (концентрация гексадекана 2%, соотношение углерод/азот 49:1, коэффициент массопереноса 0.11-0.14 г О₂ / л ч, температура 20°C). Показана зависимость синтеза ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 от наличия в среде культивирования ионов натрия и железа. Стимулирующее влияние ионов железа на рост бактерий и синтез ПАВ может свидетельствовать о функционировании у *R. erythropolis* ЕК-1 алкангидроксилазного комплекса, содержащего железосеропротеид рубредоксин.

В составе липидов, синтезируемых *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекане, выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты), фосфолипиды и общие липиды (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир н-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты и др.). Качественный состав липидов зависит от условий культивирования *R. erythropolis* ЕК-1.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, биосинтез, *Rhodococcus erythropolis*, условия культивирования, гликолипиды, общие липиды

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) микробного происхождения вызывают большой интерес у широкого круга исследователей – микробиологов, биохимиков, биотехнологов, экологов. Этот интерес обусловлен той ролью, которую выполняют поверхностно-активные вещества в жизнедеятельности клетки, их значением во взаимодействии микроорганизмов с окружающей средой. Микробные ПАВ благодаря уникальным физико-химическим свойствам привлекают внимание исследователей при решении определенных практических задач. Практическое значение микробных ПАВ обусловлено их способностью существенно снижать поверхностное и межфазное натяжение водных растворов и эмульгировать различные вещества. Несмотря на то, что микробные ПАВ являются относительно новым продуктом биотехнологии, они находят широкое применение для очистки окружающей среды, в нефтедобывающей, химической, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

Ранее нами было показано, что штамм *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, выделенный из загрязненной нефтью почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах [1]. Предыдущие наши исследования были посвящены изучению синтеза ПАВ при росте штамма на этаноле. Это было обусловлено тем, что в литературе отсутствуют сведения о синтезе ПАВ родококками на этом субстрате.

Однако наиболее высокие показатели синтеза ПАВ наблюдались при росте штамма *R. erythropolis* ЕК-1 на гидрофобных субстратах. В связи с этим целью настоящей работы было изучение закономерностей синтеза ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 при росте на гексадекане.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследований. В работе использовали штамм *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [1], депонированный в Украинской коллекции микроорганизмов под номером Ас-5017.

Культивирование *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава (г/л): **Среда 1:** KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, pH 6,8-7,0. **Среда 2:** KH_2PO_4 – 6,8; NaOH – 1,0; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, pH 6,8-7,0. В качестве источника углерода и энергии использовали гексадекан в концентрации 1, 2 и 3% (по объему). В одном из вариантов NH_4NO_3 в среде 2 был заменен на эквимольную по азоту концентрацию KNO_3 (1,5 г/л). Бактерии выращивали также на средах 1 и 2, содержащих в качестве источника азота KNO_3 (1,0 г/л) или NaNO_3 (0,85 г/л). Указанная концентрация NaNO_3 эквимольна по азоту 1,0 г/л нитрата калия.

При изучении влияния соотношения углерод/азот в среде культивирования бактерии выращивали на среде 1, содержащей 2% (по объему) гексадекана и KNO_3 в концентрации 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 г/л (соотношение C/N составляло 146:1; 73:1; 48,7:1 и 36,5:1 соответственно).

В одном из вариантов *R. erythropolis* ЕК-1 выращивали на среде 1, в которую дополнительно вносили (отдельно или в различных комбинациях) дрожжевой автолизат (0,5% по объему), раствор микроэлементов [2] и $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 г/л).

Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (220 об/ч) при 30°C в течение 120 и 168 ч.

Для исследования синтеза ПАВ при различных режимах массообмена бактерии выращивали в следующих условиях:

- 1) скорость перемешивания 150 об/мин, колбы объемом 250 мл со 100 мл среды;
- 2) скорость перемешивания 220 об/мин, колбы объемом 750 мл со 100 мл среды;
- 3) скорость перемешивания 320 об/мин, колбы объемом 750 мл со 100 мл среды.

Массообменные характеристики при культивировании бактерий в указанных выше условиях оценивали по сульфитному числу K_s , которое определяли по методу, описанному в работе [3].

При изучении влияния температуры на синтез ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 его выращивали при температуре 20, 25 и 30°C.

В качестве посевного материала использовали суточную культуру, выращенную на мясо-пептонном (МПА) или глюкозо-картофельном (ГКА) агаре, а также культуру из экспоненциальной фазы роста (24 ч), выращенную на средах 1 и 2, содержащих 0,3% гексадекана (по объему). В последнем случае концентрация инокулята составляла 5% от объема засеваемой среды.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес по калибровочному графику (в случае гомогенной суспензии) или весовым методом (в случае образования конгломератов клеток). При определении биомассы весовым методом перед осаждением клеток осуществляли двухкратную отмывку культуральной жидкости гексаном для удаления остаточного гексадекана. Необходимость этой операции обусловлена соосаждением части гексадекана с клетками, что завышает значения биомассы.

Определение показателей синтеза ПАВ. Способность к синтезу ПАВ оценивали по следующим показателям:

1) поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью платиновой и стеклянной пластинки по методу Вильгельми [4]. Значение σ_s является качественным показателем, свидетельствующем о наличии ПАВ в культуральной жидкости. Для определения σ_s использовали супернатант культуральной жидкости, предварительно обработанной гексаном для удаления гексадекана, который обладает поверхностно-активными свойствами.

2) для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель, названный нами «условная концентрация ПАВ». Этот показатель определяется как степень разведения свободной от

клеток культуральной жидкости в точке падения поверхностного натяжения на кривой зависимости σ_s от значения разведения. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению условной концентрации ПАВ. Использование такого приема для определения содержания ПАВ в культуральной жидкости описано в работе [5]. Условная концентрация ПАВ, определяемая описанным способом, выражается в безразмерных единицах. В тексте условная концентрация ПАВ обозначена как ПАВ*.

3) эмульгирующая активность, которую определяли по методу, описанному в работе [6]. В качестве субстратов для эмульгирования использовали вазелиновое и подсолнечное масло. К 5 мл культуральной жидкости добавляли 5 мл эмульгируемого субстрата и встряхивали в течение 2 ч. Измерение индекса эмульгирования (E_{24}) определяли через 24 ч как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах. Эмульгирующую активность определяли для нативной культуральной жидкости и культуральной жидкости, разбавленной дистиллированной водой в 10 и 50 раз.

4) содержание углеводов в культуральной жидкости, которое анализировали по реакции с фенолом и серной кислотой [7]. Выбор этого показателя для количественного определения ПАВ был обусловлен тем, что родококки синтезируют гликолипиды, в частности трегалозолипиды [2, 8, 9, 10];

5) содержание общих липидов в культуральной жидкости, которое определяли весовым методом после экстракции смесью Фолча (хлороформ – метанол 2:1), с последующим упариванием растворителя в вакууме (40°C). Перед экстракцией общих липидов осуществляли двукратную отмывку культуральной жидкости гексаном для удаления остаточного гексадекана, который экстрагируется (вместе с общими липидами) смесью Фолча.

6) выход ПАВ от заданного субстрата, который определяли как отношение содержания общих липидов в культуральной жидкости (в г/л) к заданной концентрации гексадекана (в г/л) и выражали в г ПАВ / г биомассы.

Определение химического состава липидов. Липиды экстрагировали из культуральной жидкости, супернатанта культуральной жидкости и клеточной суспензии смесью хлороформ – метанол (2:1). Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 5000 g в течение 20 ч. Клеточную суспензию получали при суспендировании осадка клеток в дистиллированной воде, объем которой был равен объему исходной культуральной жидкости, из которой были осаждены клетки.

Качественный анализ липидов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 (“Merck”, Германия) в системах растворителей: полярная система – хлороформ – метанол – вода (85:15:1 и 65:25:4); неполярная система I – гексан – диэтиловый эфир (2:1); неполярная система II – гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90:10:1).

Идентификацию липидов осуществляли путем окрашивания пластинок спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и парами йода (общие липиды), раствором нингидрина (пептидолипиды), анисовым альдегидом и антроновым реактивом (гликолипиды и фосфолипиды) [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способность микроорганизмов использовать водонерастворимые гидрофобные субстраты обусловлена двумя механизмами [12]: поглощение субстрата в результате прямого взаимодействия клеток с каплями углеводорода и биосурфактант-опосредованное взаимодействие клеток и субстрата. Необходимым условием прямого контакта клеток и углеводорода является высокая гидрофобность клеточной поверхности; в этом случае углеводороды проникают в клетку в виде субмикроскопических капель. При втором механизме синтезированные клеткой ПАВ солюбилизируют или эмульгируют гидрофобные субстраты, облегчая их поступление в клетку. Многие микроорганизмы, растущие на углеводородах, реализуют оба механизма, т.е. характеризуются как высокой гидрофобностью клеточной поверхности, так и обладают способностью к синтезу ПАВ [12]. В связи с этим большинство известных продуцентов, в том

числе и представители рода *Rhodococcus*, синтезируют ПАВ при росте на гидрофобных субстратах [2, 8 – 10, 13].

Наши предыдущие исследования показали [1], что наиболее низкие значения поверхностного натяжения (σ_s , 30-39 мН/м) и высокие значения ПАВ* (2,5-6,0) были отмечены для супернатанта культуральной жидкости, полученной после выращивания *R. erythropolis* ЕК-1 на гидрофобных субстратах (гексадекан, жидкие парафины). На гидрофильных субстратах (этанол, глюкоза) показатель σ_s повышался до 50-55 мН/м, а ПАВ* снижался до 1,1-1,2.

Образование ПАВ, как и других продуктов микробного синтеза, зависит от условий выращивания продуцента, в частности, от природы и концентрации источников углеродного и азотного питания, соотношения С/Н, рН, температуры, времени культивирования и других факторов [8 – 10, 14].

Данные по исследованию влияния концентрации гексадекана и длительности процесса культивирования *R. erythropolis* ЕК-1 на синтез ПАВ приведены в табл.1. Наиболее высокие показатели синтеза ПАВ наблюдались при выращивании бактерий на средах с 2% гексадекана в течение 7 сут. Следует отметить, что максимальное количество ПАВ отмечено при 3% гексадекана, однако при этом снижался их выход по отношению к заданному субстрату. Данные по условной концентрации ПАВ (ПАВ*) в культуральной жидкости (не выше 4,4), представленные в табл.1, несколько ниже приведенных нами ранее – до 6,0 [1]. Такие различия объясняются тем, что в данной работе при определении поверхностного натяжения и показателя ПАВ* осуществляли удаление из культуральной жидкости остаточного гексадекана, который обладает поверхностно-активными свойствами. Следует также отметить, что при обработке культуральной жидкости гексаном в гексановую фракцию вместе с остаточным гексадеканом переходит и часть полярных и неполярных липидов, вследствие чего снижается показатель ПАВ*, а также и концентрация ПАВ, определяемая в г/л. Однако погрешность при измерении ПАВ*, обусловленная наличием остаточного гексадекана, является более существенной по сравнению с

возможными потерями неполярных липидов при обработке культуральной жидкости гексаном.

При культивировании *R. erythropolis* ЕК-1 на среде 1 показатели синтеза ПАВ были выше, чем на среде 2, что может быть объяснено снижением рН на среде 2 до неоптимального для образования ПАВ значения (табл. 1). Из литературы известно, что максимальный синтез ПАВ наблюдается при нейтральном значении рН [8, 14]. В связи с этим исследовали синтез ПАВ на среде 2, в которой нитрат аммония был заменен на эквимолярную по азоту концентрацию нитрата калия (табл. 2). Это сопровождалось стабилизацией рН в процессе культивирования на уровне 7-7,3; при этом показатель ПАВ* увеличивался до 2,9-3,5, а концентрация ПАВ – в 1,5-1,7 раза. Очевидно, увеличение синтеза ПАВ обусловлено поддержанием рН на уровне, близкому к нейтральному, в результате ассимиляции бактериями нитратного источника азота.

Однако показатели синтеза ПАВ на среде 1 были выше, чем на среде 2, поэтому в дальнейших исследованиях для выращивания *R. erythropolis* ЕК-1 использовали среду 1. Следует отметить также, что данная среда проще по составу и экономичнее – общее содержание солей в ней в три раза ниже, чем в среде 2.

Одним из факторов, существенно влияющих на синтез ПАВ, является соотношение С/Н в среде культивирования [8, 14, 15]. Наши эксперименты показали, что оптимальным для синтеза ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 является соотношение углерод/азот, равное 49:1 (табл. 3).

Первой реакцией катаболизма углеводов является их окисление до соответствующих спиртов при участии кислорода под действием ферментов монооксигеназ [16, 17]. В связи с этим уровень аэрации (массообмен) является важным фактором, влияющим на образование ПАВ при росте продуцента на гексадекане. Установлено, что для максимального синтеза ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 сульфитное число должно быть не менее 0,11 г O₂ / л ч (табл. 4).

Дальнейшие эксперименты показали, что замена нитрата калия в среде культивирования *R. erythropolis* ЕК-1 на эквимоллярную по азоту концентрацию нитрата натрия сопровождается повышением показателей синтеза ПАВ (табл. 5). На сегодняшний день механизм положительного влияния ионов натрия на синтез ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 остается неизвестным, но можно предположить, что Na^+ является либо активатором ферментов, участвующих в синтезе ПАВ, либо необходим для обеспечения транспорта субстрата в клетки (создания ионных градиентов на мембране и генерации протондвижущей силы).

В литературе описан психрофильный штамм *Rhodococcus* sp. – продуцент ПАВ, растущий в интервале температуры 5 – 30°C [13]. Оптимальной температурой для роста *R. erythropolis* ЕК-1 является 30°C. Снижение температуры культивирования данного штамма до 20°C сопровождалось уменьшением уровня биомассы, однако при этом наблюдали повышение синтеза ПАВ (табл. 6).

Исследование зависимости образования ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЕК-1 от способа приготовления посевного материала показало, что при использовании инокулята, выращенного на МПА и ГКА, показатели синтеза ПАВ были практически одинаковыми (табл. 7). При применении посевного материала, выращенного на жидких минеральных средах с гексадеканом, наблюдали снижение показателей роста и синтеза ПАВ на среде 1, в то время как на среде 2 эти показатели были несколько выше по сравнению с использованием инокулята с агаризованных сред. Внесение в среду 1 дрожжевого автолизата и микроэлементов не сопровождалось повышением синтеза ПАВ. Анализ состава обеих сред показал, что среда 1 (в отличие от среды 2) не содержит ионов железа. Из литературы известно, что у многих микроорганизмов (представителей родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*) окисление углеводов происходит под действием трехкомпонентного алкангидроксилазного ферментного комплекса, состоящего из мембрансвязанной алканмонооксигеназы и двух растворимых белков – рубредоксина и рубредоксинредуктазы [16-18]. Рубредоксин представляет собой железосеропротеид. В работе [18] отмечается,

что синтез алкангидроксилазы у *Pseudomonas oleovorans* зависит от наличия достаточного количества ионов железа в среде культивирования. Наши эксперименты показали, что внесение в среду 1 ионов железа сопровождалось увеличением показателей роста и синтеза ПАВ (табл. 7). Эти результаты могут свидетельствовать о функционировании в клетках *R. erythropolis* ЕК-1 алкангидроксилазного ферментного комплекса, содержащего рубредоксин.

Выращивание *R. erythropolis* ЕК-1 в оптимальных условиях (концентрация гексадекана 2%, соотношение С/Н = 49:1, источник азота NaNO_3 , наличие ионов железа в среде, коэффициент массопереноса $0,14 \text{ г O}_2 / \text{л ч}$, температура 20°C , время культивирования 168 ч) позволяет существенно повысить синтез ПАВ – условная концентрация ПАВ повышается до 6,0-6,5, количество синтезированных ПАВ – до 8,0-8,5 г/л; индекс эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости составляет 46-50%, а величина поверхностного натяжения снижается до 29,4-29,8 мН/м.

Изучение химического состава общих липидов, синтезируемых *R. erythropolis* ЕК-1 при росте на гексадекане, показало, что, как и при культивировании бактерий на этаноле [1] синтезируются свободные и ассоциированные с клетками ПАВ (табл. 8). Из данных табл. 8 видно, что все исследуемые образцы (культуральная жидкость, супернатант и клетки) характеризовались наличием трегалозокориномиколатов. Однако качественный состав гликолипидов зависел от условий культивирования (состава среды и коэффициента массопереноса). Так, трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты были выявлены при выращивании *R. erythropolis* ЕК-1 на среде 1 при K_s , равном $0,11 \text{ г O}_2 / \text{л ч}$. При снижении значения K_s в составе внеклеточных гликолипидов отсутствовал трегалозомонокориномиколат. При культивировании бактерий на среде 2 в составе внеклеточных и ассоциированных с клетками гликолипидов был выявлен только трегалозодикориномиколат. Ранее нами было показано, что при выращивании *R. erythropolis* ЕК-1 на этаноле трегалозомиколаты не были выявлены (или регистрировались в следовых количествах) в составе ассоциированных с

клетками ПАВ [1]. Это явление можно объяснить тем, что *R. erythropolis* ЕК-1 выращивали на гидрофильном субстрате – этаноле, а трегалозомиколаты облегчают потребление гидрофобных соединений и, как правило, содержатся в клеточных стенках при культивировании на парафинах, нефти, гексадекане и др. [9, 10, 19]. Качественный состав общих липидов, как и гликолипидов, также зависел от условий культивирования продуцента (табл. 8). Наиболее широкий спектр липидов синтезировался при культивировании *R. erythropolis* ЕК-1 в оптимальных условиях на среде 1 при K_s , равном 0,11 г O_2 / л ч. Следует отметить, что при этом существенно увеличивалось содержание внеклеточных липидов и снижалось количество липидов, ассоциированных с клетками, а также в составе синтезированных ПАВ были выявлены фосфолипиды (табл. 8) и следовые количества пептидолипидов.

Таким образом, в результате проведенной работы установлены оптимальные условия культивирования штамма *R. erythropolis* ЕК-1 (состав среды, концентрация гексадекана, соотношение С/Н, режимы массообмена, температура), обеспечивающие максимальный синтез ПАВ. Показатели синтеза ПАВ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане сравнимы с синтезирующей способностью родококков, описанных в литературе [2, 8, 10]. Однако по сравнению с другими представителями рода *Rhodococcus* селекционированный нами штамм имеет следующие преимущества: 1) способен синтезировать ПАВ на среде с общим содержанием солей менее 3 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; 4) синтезирует ПАВ при температуре 20°C.

Влияние концентрации гексадекана и времени культивирования на синтез поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Среда	Концентрация гексадекана, %	Время культивирования, ч	Показатели синтеза ПАВ						
			рН _{конечное}	ПАВ*	ПАВ, г/л	Выход ПАВ от заданного субстрата, %	Индекс эмульгирования культуральной жидкости (субстрат – вазелиновое масло), %		
							Без разбавления	1:9	1:49
1	1,0	120	6,7	1,6	1,0	16,7	90	63	60
		168	6,7	2,4	1,75	29,2	80	71	65
	2,0	120	6,6	3,8	3,0	25,0	60	60	60
		168	6,7	4,3	5,0	41,7	71	66	62
	3,0	120	6,3	3,8	Н.о.*	Н.о.	56	Н.о.	Н.о.
		168	6,5	4,4	5,5	29,4	53	52	50
2	1,0	120	5,7	1,3	Н.о.	Н.о.	74	Н.о.	Н.о.
		168	5,7	1,7	0,95	15,8	53	47	42
	2,0	120	5,8	1,5	Н.о.	Н.о.	58	55	54
		168	5,6	2,2	2,6	21,7	56	53	47
	3,0	120	5,7	1,6	Н.о.	Н.о.	60	58	56
		168	5,6	2,3	2,7	15,0	60	53	53

Примечания: Посевной материал с ГКА, $K_s = 0, 11 \text{ г О}_2 / \text{л ч}$. Состав сред указан в разделе “Материалы и методы”.

*Н.о. – не определяли.

Таблица 2

**Зависимость синтеза поверхностно-активных веществ штаммом
Rhodococcus erythropolis ЕК-1 от природы источника азотного питания**

Концентрация гексадекана, %	Источник азота	pH _{конечное}	ПАВ*	Индекс эмульгирования культуральной жидкости, %	ПАВ, г/л	Выход ПАВ от заданного субстрата, %
1,0	NH ₄ NO ₃	5,7	1,7	53	0,95	15,8
	KNO ₃	7,2	2,9	48	1,8	30,0
2,0	NH ₄ NO ₃	5,6	2,2	56	2,6	21,7
	KNO ₃	7,4	3,4	58	3,8	31,7
3,0	NH ₄ NO ₃	5,6	2,3	60	2,7	15,0
	KNO ₃	7,35	3,5	56	3,9	21,7

Примечания: Культивирование осуществляли на среде 2 в течение 168 ч. Посевной с ГКА, K_s = 0, 11 г O₂ / л ч. Субстрат для эмульгирования – вазелиновое масло. Концентрация нитрата калия (1,5 г/л) эквивалентна по азоту 0,6 г/л нитрата натрия.

Таблица 3

**Образование ПАВ в зависимости от соотношения углерод/азот в среде
культивирования *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1**

Содержание KNO ₃ , г/л	Соотношение C/N	ПАВ*	Индекс эмульгирования культуральной жидкости (субстрат – подсолнечное масло), %		
			Без разбавления	1:9	1:49
0,5	146:1	1,3	65,1	54,4	56,4
1,0	73:1	4,3	47,8	51,4	51,6
1,5	48,7:1	4,6	54,4	61,2	63,6
2,0	36,5:1	4,5	51,5	59,9	58,0

Примечания: Культивирование осуществляли на среде 1, содержащей 2% гексадекана, в течение 168 ч. Посевной с ГКА, K_s = 0, 11 г O₂ / л ч.

Влияние массообмена на синтез поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

K _s , гО ₂ /л ч	Концентрация гексадекана, %	ПАВ*	Индекс эмульгирования культуральной жидкости (субстрат – подсолнечное масло), %		
			Без разбавления	1:9	1:49
0,04	1,0	1,3	55,5	42,6	33,3
	2,0	1,6	50,9	40,3	39,4
0,11	1,0	2,4	30,3	36,8	40,8
	2,0	4,3	47,8	51,4	51,6
0,14	1,0	2,6	32,0	35,8	41,8
	2,0	4,3	37,9	56,8	56,4

Примечания: Культивирование осуществляли на среде 1, содержащей 1,0 г/л КНО₃, в течение 168 ч. Посевной с ГКА.

Таблица 5

Влияние катионов натрия на синтез поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Среда	Источник азота	Показатели синтеза ПАВ		
		ПАВ*	Индекс эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости (субстрат – подсолнечное масло), %	Содержание углеводов в культуральной жидкости, г/л
1	КНО ₃	2,4	40,8	1,04
	NaNO ₃	4,6	38,3	1,88
2	КНО ₃	2,1	49,8	0,64
	NaNO ₃	2,8	40,3	1,30

Примечания: 1. Концентрация гексадекана – 1%, посевной с ГКА, время культивирования – 168 ч, K_s = 0,11 г О₂ / л ч. Концентрации КНО₃ (1 г/л) и NaNO₃ (0,85 г/л) эквивалентны по азоту.

Зависимость синтеза поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 от температуры культивирования

Температура, °С	ПАВ*	Биомасса, г/л	Индекс эмульгирования культуральной жидкости (субстрат – подсолнечное масло), %		
			Без разбав- ления	1:9	1:49
20	2,8	0,95	50,2	47,6	48,9
25	2,1	1,15	55,3	43,4	47,9
30	1,3	1,35	55,5	42,6	33,3

Примечания: 1. Культивирование осуществляли на среде 1, содержащей 1% гексадекана, 1,0 г/л KNO₃, в течение 168 ч, K_s = 0,04 г O₂/л ч. Посевной с ГКА.

Таблица 7

Влияние способа приготовления инокулята на синтез ПАВ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Среда для получе- ния ино- кулята	Среда культи- вирова- ния	Наличие ионов железа в среде культиви- рования	Показатели процесса			
			Биомас- са, г/л	Угле- воды, г/л	ПАВ*	Индекс эмульгирования культуральной жидкости (субстрат – подсолнечное масло), %
ГКА	1	-	1,3	0,79	4,3	47,8
МПА	1	-	1,35	0,85	4,2	49,6
Среда 1	1	-	0,40	0,11	1,8	50,2
		+	1,50	1,30	4,5	51,9
Среда 2	2	-	1,25	0,58	3,5	53,7
		+	1,30	0,63	3,6	54,2

Примечания: 1. Концентрация гексадекана в средах 1 и 2 при получении инокулята 0,3%; при культивировании – 2%. Концентрация нитрата калия в средах 1 и 2 – 1 г/л. K_s = 0,11 г O₂/л ч, время культивирования 168 ч.

Характеристика липидов, синтезируемых штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на среде с гексадеканом

Условия культивирования	Локализация липидов	Качественный состав общих липидов	Качественный состав глико- и фосфолипидов
Среда 2, 1% гексадекана, 1,0 г/л KNO ₃ , K _s = 0,11 гO ₂ /л ч	Культуральная жидкость Супернатант Клетки	Цетиловый спирт, триглицерид, метиловый эфир <i>n</i> -пентадекановой кислоты (следы) « « Цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, триглицериды	Трегалозодикориномиколат « « « «
Среда 1, 1% гексадекана, 1,0 г/л KNO ₃ , K _s = 0,11 гO ₂ /л ч	Культуральная жидкость Супернатант Клетки	Цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир <i>n</i> -пентадекановой кислоты триглицерид « « « «	Трегалозомонокориномиколат Трегалозодикориномиколат « « « «
Среда 1, 1% гексадекана, 1,0 г/л KNO ₃ , K _s = 0,04 гO ₂ /л ч	Супернатант	Цетиловый спирт, триглицерид	Трегалозодикориномиколат
Среда 1, 2% гексадекана, 1,3 г/л NaNO ₃ , 0,0001 г/л FeSO ₄ K _s = 0,11 гO ₂ /л ч	Культуральная жидкость Супернатант Клетки	Цетиловый спирт, триглицерид, метиловый эфир <i>n</i> -пентадекановой кислоты, пальмитиновая кислота, миколовые кислоты, эфир жирной кислоты, метиловый эфир миколовой кислоты, эфир пентадекановой кислоты « « Цетиловый спирт, метиловый эфир <i>n</i> -пентадекановой кислоты, пальмитиновая кислота, миколовые кислоты, эфир жирной кислоты, метиловый эфир миколовой кислоты, эфир пентадекановой кислоты	Трегалозодикориномиколат, трегалозомонокориномиколат, фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин « « Трегалозодикориномиколат, фосфатидилглицерин, фасфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40. – №5. С.
2. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. // Journal of General Microbiol. – 1979. – V. 115. – P. 491-503.
3. Cooper C.M., Fernstrom G.A., Miller S.A. // Ind.Eng. Chem. – 1944. – N36. – P. 504-507.
4. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Райнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение. – Л.: Химия, 1988. – С. 200
5. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – V. 48. – N 2. – P. 301-305.
6. Cooper D.C., Goldenger B.G. // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – N 2. – P. 224-229.
7. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. // Anal. Chem. – 1956. – V. 28. – № 3. – P. 350-356.
8. Desai J.D., Banat I.M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61. – N 1. – P. 47-64.
9. Lang S., Philp J.C. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 74. – P. 59-70.
10. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 154-162.
11. Addo S., Saito M. Chromatography lipid biomedical research and chemical diagnostic. Amsterdam: Elsevier. – 1987. – С. 266
12. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P. // Journal of Appl. Microbiol. – 1999. – V. 86. – P. 421.
13. Rapp P., Gabriel-Jurgens L.H. // Microbiology. – 2003. – V. 149. – P. 2879-2890.
14. Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A. // Microbiol. Res. – 2001. – V. 155. – N 4. – P. 249-256.
15. Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Pereria N.Jr., Alves T.L., Menezes E.P., Freire D.M. // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2001. – V. 91-93. – P. 459-467.

16. *Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbe D., Wilholt B., Greer C.W., van Beilen J.B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – N 12. – P. 5933-5942.
17. *van Beilen J.B., Neuenschwander M., Smits T.N.M., Roth C., Balada S.B., Wilholt B.* // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184. – N. – P. 1722-1732.
18. *Staijen I.E., Wilholt B.* // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – V. 57. – N 2. – P. 228-237.
19. *Kretschmer A., Wagner F.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – V. 753. – P. 306-313.