

Д.О. ТАРАСЕНКО, магістрант  
Національний університет харчових технологій

## МОДИФІКАЦІЯ МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* ЕК-1

Модифіковано метод кількісного визначення поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 в процесі культивування на гексадекані та етанолі. Внесення 1М НСІ у класичну систему розчинників (хлороформ:метанол=2:1) дає змогу вилучати як неполярні, так і полярні ПАР ліпідної природи. Спостерігалось значне підвищення ефективності екстракції (збільшення вмісту визначуваних метаболітів на 30-55% в порівнянні з класичною методикою). Висунуто гіпотезу про механізм дії модифікованої системи розчинників, оптимізовано і обґрунтовано кількість стадій екстракції.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, екстракція, система розчинників, *Rhodococcus erythropolis*, концентрація, цільовий метаболіт, полярні й неполярні ліпіди

Модифицирован метод количественного определения поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 в процессе культивирования на гексадекане и этаноле. Внесение 1М НСІ в классическую систему растворителей (хлороформ:метанол = 2:1) позволяет извлекать как полярные, так и неполярные ПАВ липидной природы. Наблюдали значительное увеличение эффективности экстракции (увеличение содержания определяемых метаболитов на 30-55% по сравнению с классической методикой).

Выдвинута гипотеза про механізм действия модифицированной системы растворителей, оптимизировано и обосновано количество стадий экстракции.

**Ключевые слова:** поверхностно-активные вещества, экстракция, система растворителей, *Rhodococcus erythropolis*, концентрация, целевой метаболит, полярные и неполярные липиды.

Упродовж останніх 15-20 років мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР, біосурфактанти) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлено їх унікальними фізико-хімічними властивостями [1]. Раніше на кафедрі біотехнології мікробного синтезу із забруднених нафтою зразків ґрунту та води було ізольовано штаб *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, який синтезує ПАР під час культивування на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) та гідрофільних (етанол, глюкоза) субстратах. Встановлено, що *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує комплекс полярних (трегалозо-6-ацилати, трегало-6-міколати, трегалозодіацилати; міколові кислоти, 3-кето-2-алкіл жирні кислоти, триацилгліцероли) і неполярних (цетиловий спирт; метиловий ефір-н-пентадеканової кислоти) ліпідів [2], а відомий метод Блайя і Дайера [3], що застосовується для виділення ПАР, дає змогу аналізувати кількісний вміст неполярних ліпідів. Відповідно, використовуючи класичну методику визначення концентрації ПАР, ми отримували занижені результати, тому метою даної роботи стала модифікація системи розчинників, яка дає змогу максимально повно вилучати як полярні, так і неполярні ліпіди.

Основним об'єктом досліджень був штаб *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, депонований в Депозитарії

Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України під номером Ас-5017.

Бактерії культивували на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): **середовище 1**, ( $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, рН 6,8 – 7,0) і **середовище 2**, ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{NaOH}$  – 1,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 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;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, рН 6,8–7,0). Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол і гексадекан в концентрації 2% (об'ємна частка).

Як інокулянт використовували культуру із експоненційної фази росту, вирощену на рідких середовищах 1 і 2, що містили 1% (об'ємна частка) гексадекану, етанолу. Кількість посівного матеріалу становила 5% від об'єму середовища.

Як попередники синтезу ПАР використовували цитрат натрію в концентрації 0,1-0,5% і фумарат натрію в концентрації 0,1-0,3%. Цитрат натрію і фумарат натрію вносили в середовище у вигляді 10%-х розчинів. Внесення попередників синтезу ПАР здійснювали на початку процесу культивування, а також при виході культури на стаціонарну фазу росту [4, 5].

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсо-



рідині дає змогу підвищити визначувані концентрації біосурфактантів у 1,3-1,55 рази. Максимально ефективним запропонований метод виявився у разі аналізу ПАР, синтезованих на середовищі з гексадеканом; приріст концентрації цільового метаболіту склав 53,4 %.

Встановлено, що оптимальним режимом кількісного визначення є триразове екстрагування ліпідів з супернатанту культуральної рідини. Так, з табл. 2 видно, що за одноразової екстракції концентрація ПАР у органічній фазі становила 1,5 г/л. Збільшення кількості стадій екстракції до трьох дозволяє більш ніж на 25 % підвищити кількість екстрагованих ліпідів. Необхідно зауважити, що максимальне вилучення ліпідів було зафіксоване при чотирьохстадійній екстракції (1,95 г/л). Проте, за такої схеми приріст концентрації суттєво не збільшувався у порівнянні з трьох стадійним процесом (0,5 %) і знаходився на рівні стандартної похибки вимірювань (табл. 2.)

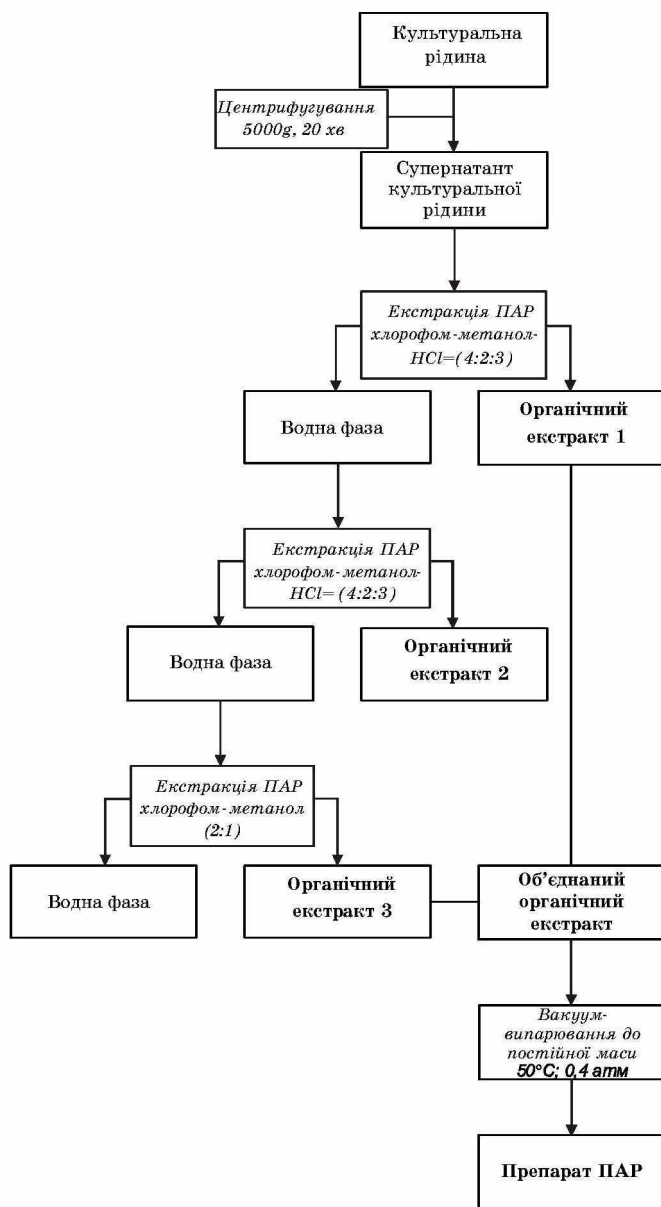


Рис. Схема проведення екстракції метаболітів ліпідної природи

Таблиця 2

**Ефективність вилучення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 залежно від кількості стадій екстракції**

Стадія екстракції	$C_{\text{ПАР}}$ , г/л	$\Delta C_{\text{ПАР}}$ , г/л	$\epsilon$ , %
«1»	1,50	—	—
«2»	1,86	0,36	24,0
«3»	1,90	0,04	2,1
«4»	1,91	0,01	0,5

**Висновки.** У результаті проведеної роботи модифіковано метод виділення поверхнево-активних речовин, синтезованих штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 в процесі культивування на гексадекані та етанолі. Запропонована методика дає змогу підвищити у 1,3-1,55 раза кількість вилучених поверхнево-активних речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
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 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 544—550.
3. Биохимические исследования мембран / Под ред. Э. Медди. М.: Мир. — 1979. — 300 с.
4. Вильданова-Марцишин Р.И. Биосинтез поверхностно-активных веществ штаммами *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1169, *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1163 и *Pseudomonas* sp. PS-17. Дисс.канд. биол. наук. — Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2004. — 155 с.
5. Пульга А.Н. Поверхностно-активные соединения, образуемые культурой бактерий *Bacillus subtilis* С-14. Дисс. канд. биол. наук. — Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1993. — 163 с.

Одержана редколлегією 18.06.08 р.