

УДК 759.873.088.5:661.185

*М.О. Шулякова, магістрант*  
*Т.П. Пирог, д-р біол. наук*  
*Національний університет*  
*харчових технологій*

**ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОГО  
МОЛЯРНОГО СПІВВІДНОШЕННЯ  
ГЛІЦЕРИНУ ТА ГЕКСАДЕКАНУ  
ДЛЯ СИНТЕЗУ  
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ  
РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS*  
*ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017**

*Теоретичний розрахунок енергетичних потреб синтезу трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитного гліцерину показав, що оптимальним для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) є молярне співвідношення субстратів 1:7. За таких умов спостерігали збільшення умовної концентрації ПАР на 38 % та 122 % порівняно з ростом бактерій на моносубстратах гексадекані та гліцерині відповідно.*

*Одержані дані є вихідними для розробки технології синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017, які можуть бути використані у різних галузях промисловості та природоохоронних технологіях.*

**Ключові слова:** *поверхнево-активні речовини, культивування, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, енергетично нерівноцінні ростові субстрати, молярне співвідношення, гліцерин, гексадекан.*

В останні роки поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлено можливістю їх практичного використання у різних галузях промисловості та природоохоронних біотехнологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків. Перевагами мікробних ПАР в порівнянні з хімічними аналогами є біодеградабельність, нетоксичність, сталість фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні рН і температур [1, 3].

Однак, доцільність практичного використання ПАР залежить передусім від економічної ефективності їх виробництва. Висока на сьогодні собівартість мікробних ПАР зумовлена великими витратами на біосинтез і виділення цільового продукту, а також невисокою продуктивністю штамів-продуцентів [1]. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими й пріоритетними у біотехнології мікробних ПАР. Для підвищення ефективності технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів, у тому числі й ПАР, дослідники використовують такі підходи, як оптимізація умов культивування продуцентів, внесення у середовище екзогенних попередників біосинтезу, визначення можливих «вузьких» місць метаболізму і розробка шляхів їхнього усунення [1].

Також одним із шляхів удосконалення технологій мікробного синтезу є культивування продуцентів на суміші ростових субстратів, що дає змогу уникнути непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце за використання моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у вторинні метаболіти [1].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено можливість інтенсифікації синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші енергетично надлишкового гексадекану та енергетично дефіцитного гліцерину та встановлено оптимальний спосіб підготовки інокуляту для цього процесу [4]. Але для забезпечення макси-

© М.О. Шулякова, Т.П. Пирог, 2012

мальної конверсії вуглецю в цільовий продукт необхідне встановлення оптимального для його синтезу молярного співвідношення концентрацій моносубстратів в суміші [1]. Це потребує попереднього здійснення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті з наступним визначенням концентрації енергетично надлишкового субстрату, що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес.

У зв'язку з цим мета даної роботи полягала у визначенні енергетичних потреб синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші гексадекану і гліцерину з подальшим встановленням оптимального для біосинтезу молярного співвідношення цих субстратів.

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 1,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{NaCl}$  — 0,1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001; pH 6,8-7,0.

Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш гексадекану (0,5 %, об'ємна частка) та гліцерину (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 %, об'ємна частка) у молярному співвідношенні 1:6; 1:7; 1:8; 1:9, відповідно.

Посівним матеріалом слугувала культура *R. erythropolis* IMB Ac-5017 з експоненційної фази росту (48 год), вирощена на рідкому мінеральному середовищі наведеного вище складу. Джерелом вуглецю в середовищі для одержання інокуляту були моносубстрати гексадекан, 0,5 % та гліцерин, 0,5 %. 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 30 °С.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР\*) визначали як описано раніше [3, 4].

Для розрахунку оптимального співвідношення гексадекану й гліцерину в середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 необхідно знати шляхи метаболізму цих енергетично нерівноцінних ростових субстратів у даного штаму, структуру синтезованих ПАР, а також співвідношення P/O [1].

Наші дослідження особливостей метаболізму гліцерину у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 показали, що штам метаболізує цей субстрат через дигідроксиацетонфосфат за участю ПХХ-залежної гліцеролдегідрогенази (активність  $93 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку) та дигідроксиацетонкінази (активність  $288 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку), а також через гліцерол-3-фосфат за участю гліцеринкінази (активність  $800 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку) та гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (активність  $108 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку) [5].

Раніше було встановлено [2, 3], що у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 функціонує повний цикл трикарбонних кислот, однак низька активність 2-оксоглутаратдегідрогенази (активність 10-20  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка) свідчить, що ЦТК виконує переважно біосинтетичну роль; поповнення пулу  $\text{C}_4$ -дикарбонних кислот здійснюється у гліоксилатному циклі (активність ізоцитратліази і малатсинтази 730—740 і 137—165  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку відповідно). У синтезі вуглеводів беруть участь обидва ключові ферменти гліоконеогенезу: ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза (203—603 і 556—943  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку відповідно). Ензиматичні дослідження також підтвердили здатність штаму IMB Ac-5017 до синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів (активність трегалозофосфатсинтази 66—679  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білку).

Отже, для встановлення співвідношення концентрацій гексадекану й гліцерину в середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 необхідно було: 1) розрахувати енергетичні потреби синтезу біомаси і трегалозоміколатів на енергетично-дефіцитному субстраті; 2) визначити концентрацію енергетично-надлишкового субстрату, яка б компенсувала втрати вуглецю гліцерину при його окисненні до  $\text{CO}_2$  з метою отримання енергії для конструктивного метаболізму.

При проведенні розрахунків нами було зроблено такі припущення: 1) гексадекан використовується переважно як джерело енергії, а на синтез біомаси і трегалозо-

## БИОТЕХНОЛОГИЯ,      МИКРОБИОЛОГИЯ

міколатів витрачається вуглець гліцерину; 2) міколовою кислотою є 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанова кислота, яка містить 34 атоми вуглецю; 4) співвідношення Р/О дорівнює 2.

На *рисунку* представлена передбачувана схема синтезу трегалозоміколатів з гліцерину.

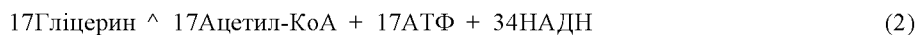
**Затрати енергії на синтез трегалозофосфату.** Як видно з наведеної схеми (*рисунку*), по одному моль АТФ витрачається на утворення дигідроксиацетонфосфату та 1,3-дифосфогліцерату, по два моля АТФ — на синтез ФЕП та триозофосфату при глікоконнеогенезі. Оскільки для утворення однієї молекули трегалози потрібно чотири молекули фосфогліцерату, на синтез яких необхідно 8 молекул гліцерину, то витрати енергії складе 28 АТФ. Крім того, один моль АТФ використовується при утворенні нуклеозиддифосфатсахариду (глюкозо-6-фосфат ^ УДФ-глюкоза). Таким чином, енергетичні потреби на синтез трегалозо-6-фосфату з гліцерину складають 29 моль АТФ.

**Затрати енергії на синтез міколових кислот.** Синтез жирних кислот відбувається таким чином: з ацетил-КоА і CO<sub>2</sub> шляхом АТФ — залежної реакції утворюється малоніл-КоА, а далі в результаті трьох послідовних реакцій синтезується бутирил-КоА. Утворений бутирил-КоА взаємодіє з наступною молекулою малоніл-КоА до утворення CH<sub>3</sub> — (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> — CO — SKoA. В наступному циклі утворюється CH<sub>3</sub> — (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> — CO — SKoA. Таким чином, у результаті послідовного нарощування двовуглецевих фрагментів на ацетил-КоА синтезуються вищі жирні кислоти у вигляді відповідних ацил-КоА. Відповідно, для синтезу 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанової кислоти необхідно 16 таких циклів. Оскільки в одному циклі витрачається 1 моль АТФ і для утворення C<sub>34</sub> — кислоти необхідно 17 моль ацетил-КоА, на синтез яких з гліцерину витратиться 17 моль АТФ, енергетичні витрати при синтезі однієї молекули мікової кислоти складуть 16 + 17 = 33 моль АТФ.

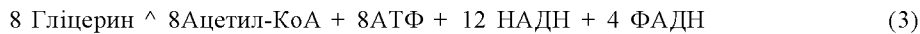
**Генерація АТФ при синтезі трегалозоміколатів з гліцерину.** Енергія генерується лише при утворенні ацетил-КоА (*рисунку*). Сумарна реакція утворення ацетил-КоА з гліцерину:



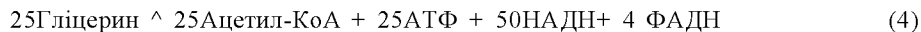
Оскільки в перетворенні беруть участь 17 моль ацетил-КоА для синтезу мікової кислоти:



та 8 моль — для синтезу трегалозофосфату:



запишемо рівняння (1) наступним чином:



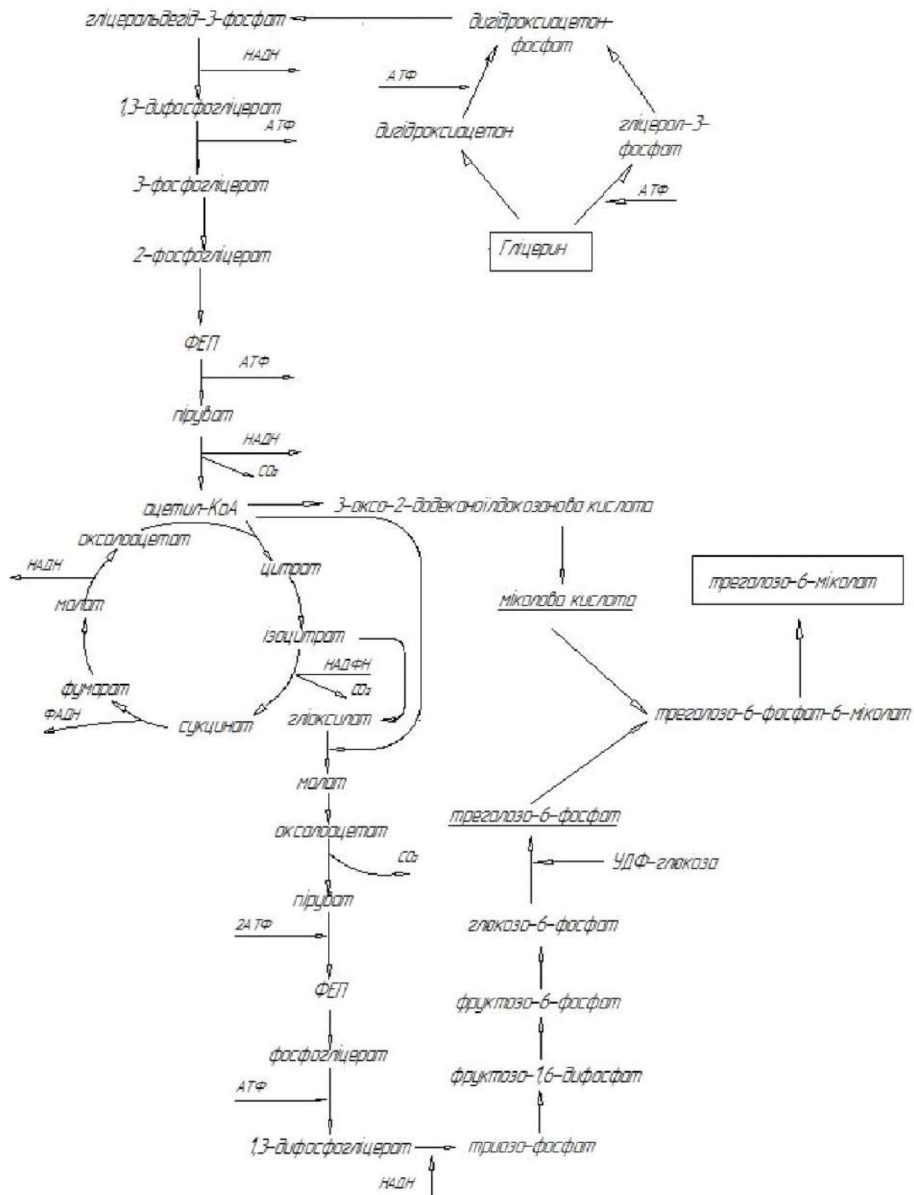
З урахуванням Р/О=2, при утворенні однієї молекули трегалозоміколату генерація енергії складає 137 молекул АТФ.

Отримані дані щодо витрати та генерації енергії в процесі синтезу трегалозоміколатів з гліцерину можна представити у вигляді табл. 1.

*Таблиця 1. Енергетичні потреби синтезу ПАР R. erythropolis ІМВ Ас-5017 з гліцерину*

Витрата гліцерину, моль	Затрати енергії, моль АТФ		Генерація енергії, моль АТФ	
	На синтез ПАР	На моль використаного гліцерину	На синтез ПАР	На моль використаного гліцерину
25	62	2,48	137	5,48

**БИОТЕХНОЛОГІЯ,      МІКРОБІОЛОГІЯ**



**Схема синтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на гліцерині**

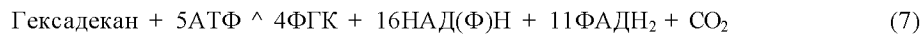
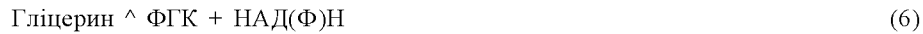
Отже, генерація енергії, яка може бути використана на утворення біомаси складе  $5,48 - 2,48 = 2,52$  моль АТФ/моль використаного гліцерину.

**Енергетичні витрати при синтезі біомаси.** Синтез біомаси з фосфогліцеринової кислоти — ключового інтермедіату синтезу всіх клітинних компонентів — можна записати у вигляді рівняння [1]:



## БИОТЕХНОЛОГИЯ,      МИКРОБИОЛОГИЯ

Сумарні реакції перетворення гліцерину та гексадекану в ФГК:



Для Р/О = 2 рівняння (6) і (7) набувають вигляду:



Виходячи з рівняння синтезу біомаси з ФГК (рівняння (5)) та рівняння катаболізму гліцерину (рівняння (8)), можна порахувати, що потреба в АТФ для синтезу біомаси складає 8 моль АТФ/моль гліцерину. Ця енергія може бути отримана з гексадекану. Враховуючи, що при синтезі ПАР з гліцерину генерується 3 моль АТФ на моль використаного гліцерину, за рахунок гексадекану повинно бути отримано  $8 - 3 = 5$  моль АТФ. З рівняння (9) виходить, що для отримання такої кількості енергії потрібно 0,13 моль гексадекану. Відповідно, співвідношення гексадекану і гліцерину в середовищі повинно бути 0,13:1, тобто 1:7,7.

Експериментально було встановлено, що показники умовної концентрації ПАР корелювали зі зміною молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів у суміші в процесі вирощування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (табл. 2). Але за співвідношення 1:8 ці показники знижувалися і за 1:9 спостерігалися найнижчі абсолютні та відносні показники синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Ймовірно, що в даному випадку підвищення вмісту ростових субстратів у середовищі мало інгібуючу дію на синтез та активність ключових ферментів метаболізму, а отже, і на ефективність перетворення вуглецю в ПАР.

На нашу думку, незначну невідповідність між експериментальним та теоретичним значенням можна пояснити тим, що синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 ПАР — це складний комплекс трегалозоміколатів, нейтральних і фосфоліпідів, причому точний вміст цих складових в утворюваних ПАР невідомий, у той час як розрахунки проводились лише для трегалозоміколату. Окрім того, постає необхідність встановлення оптимального для синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 співвідношення вуглець/азот в середовищі культивування. Адже цей показник суттєво змінювався зі зміною концентрацій моносубстратів у суміші, що могло мати значний вплив на синтез ПАР.

**Таблиця 2. Синтез ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за різного молярного співвідношення концентрацій гексадекану та гліцерину у суміші**

Співвідношення моносубстратів	ПАР*	ПАР*, % від контролю	
		гліцерин	гексадекан
1:6	4,50±0,23	169,8±8,49	107,1±5,36
1:7	6,05±0,30	221,6±11,08	137,5±6,87
1:8	4,70±0,24	162,1±8,11	104,4±5,22
1:9	3,75±0,19	131,6±6,58	81,5±4,08

Примітка. Контролі (100 %) — показники синтезу на відповідних моносубстратах, у яких концентрація вуглецю еквімолярна концентрації змішаного субстрату.

Враховуючи вищесказане, очевидно є необхідність проведення подальших досліджень у цьому напрямку, адже використання суміші енергетично нерівноцінних субстратів — досить простий та ефективний підхід для підвищення ефективності технологій мікробних ПАР.

**Висновки.** Отже, у результаті проведеної роботи здійснено попередні розрахунки енергетичних потреб синтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на енергетично дефіцитному гліцерині. Експериментально підтверджено залежність синтезу ПАВ від співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші та підтверджено, що теоретично розраховане молярне співвідношення гексадекану і гліцерину 1:7 є оптимальним для синтезу ПАВ штамом ІМВ Ас-5017.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: «Наукова думка», — 2010. — 327 с.
2. Пирог Т.П. Особенности  $C_2$ -метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Т.А. Шевчук, Д.А. Тарасенко // Микробиология. — 2008. — Т. 77, № 6. — С. 749—757.
3. Пирог Т.П. Особливості синтезу трегалозоміколатів за різних умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі і гексадекані / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Ю.О. Клименко, Д.О. Тарасенко // Харчова промисловість. — 2009. — № 8. — С. 11—14.
4. Пирог Т.П. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на среде с глицерином / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, А.Д. Конон, М.А. Шулякова, Г.А. Иутинская // Микробиол. журнал. — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20—27.
5. Пирог Т.П. Метаболизм глицерина у продуцентов поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, М.А. Шулякова // Микробиол. журнал (подано до друку).

М.А. Шулякова, Т.П. Пирог

#### Определение оптимального молярного соотношения глицерина и гексадекана для синтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Теоретический расчет энергетических потребностей синтеза трегалозоміколатов *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на смеси энергетически избыточного гексадекана и энергетически дефицитного глицерина показал, что оптимальным для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) является молярное соотношение субстратов 1:7. При таких условиях наблюдали увеличение условной концентрации ПАВ на 38 % и 122 % по сравнению с ростом бактерий на моносубстратах гексадекана и глицерине соответственно. Полученные данные являются исходными для разработки технологии синтеза ПАВ *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, которые могут быть использованы в различных отраслях промышленности и природоохранных технологиях.

**Ключевые слова:** поверхностно-активные вещества, культивирование, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, энергетически неравноценные ростовые субстраты, молярное соотношение, глицерин, гексадекан

M. Shulyakova, T. Pirog

#### Determination of the optimal molar ratio of glycerol and hexadecane for synthesis of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Energy and biochemical aspects of synthesis of biosurfactants by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 on the mixture of hexadecane and glycerol were considered. Theoretical calculation of energy needs for trehalosemicolates synthesis by strain ІМВ Ас-5017 has shown that the optimal molar ratio of energy-excessive hexadecane and energy-scarce glycerol is 1:7. Theoretically calculated ratios were confirmed experimentally. Thus, under such conditions it was observed the increase of conventional

## БІОТЕХНОЛОГІЯ,      МІКРОБІОЛОГІЯ

surfactant concentration in 38 % and 122 % compared to the bacteria cultivation on monosubstrates of hexadecane and glycerol, respectively.

Obtained data is basic for the development of economically beneficial industrial technology of SAS synthesis by *R. erythropolis* IMV Ac-5017 because the use of the mixture of energetically unequal growth substrates is rather simple and effective approach to intensification of the microbial surfactants biosynthesis. Received SAS have a wide range of potential applications and can be used in different industries and environmental technologies.

**Key words:** surface active substances, cultivation, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, energetically unequal growth substrates, molar ratio, glycerol, hexadecane

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 01.06.2012 р.