

С.В. Ігнатенко
С.І. Антонюк
Т.П. Пирог, д-р біол. наук

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ПРОЦЕСІ ВИРОЩУВАННЯ *R. erythropolis* ЕК-1 НА ГІДРОФОБНОМУ ТА ГІДРОФІЛЬНОМУ СУБСТРАТАХ

Встановлено, що показники синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) при культивуванні Rhodococcus erythropolis ЕК-1 на гексадекані були вищими у 1,5—2 рази, ніж на етанолі, і залежали від режиму масообміну та рівня аерації системи. У процесі вирощування бактерій на обох субстратах у складі синтезованих ПАР змінювалося співвідношення компонентів із емульгуювальними та поверхнево-активними властивостями.

Ключові слова: біосурфактанти, біосинтез, Rhodococcus erythropolis ЕК-1, поверхневий натяг, емульгатор.

Поверхнево-активні речовини мікробного походження (ПАР, біосурфактанти) викликають інтерес у широкого кола дослідників. Він зумовлений роллю, яку

© С.В. Ігнатенко, С.І. Антонюк, Т.П. Пирог, 2006

It was found that the indexes of surface-active substances (SAS) synthesis during the Rhodococcus erythropolis ЕК-1 cultivation using hexadecane were higher in 1,5—2 times than ethanol and depended of mass exchange condition and aeration level in the system. During bacteria growing on the both substrates in composition of synthesized SAS changed ratio of components with emulsifying and surface-active properties.

Key words: biosurfactants, biosynthesis, Rhodococcus erythropolis ЕК-1, surface strain, emulsifier.

відіграють ПАР у життєдіяльності клітини, їх значенням у взаємодії мікроорганізмів з навколишнім середовищем. Широкий спектр сфер застосування цих

речовин зумовлений їх здатністю суттєво знижувати поверхневий та міжфазний натяг у розчинах, емульгувати різні субстрати, регулювати змочуваність поверхонь та ін. Препарати мікробних ПАР є ефективнішими, ніж їх синтетичні аналоги, а такі переваги біосурфактантів як біодеградабельність та нетоксичність роблять їх особливо перспективними для створення нових екологічно безпечних технологій. Хоча мікробним ПАР притаманні унікальні фізико-хімічні властивості та вони можуть знайти застосування в багатьох галузях гос-подарства, в Україні досі не існує промислового виробництва цих препаратів, а їх дослідження проводяться обмеженим колом дослідницьких лабораторій.

На кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій проведені дослідження з пошуку та селекції нових штамів мікроорганізмів — високоактивних продуцентів біосурфактантів. Із забруднених нафтою зразків ґрунту був виділений штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, який синтезує ПАР при рості на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) та гідрофільних (глюкоза, етанол) субстратах [2]. Штам депоновано в Українській колекції мікроорганізмів під номером ІМВ Ас-5017.

Аналіз літератури виявив, що відомості відносно особливостей синтезу біосурфактантів родококами є розрізненими та несистематизованими.

Метою цієї роботи було дослідження синтезу ПАР у процесі культивування штаму *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофобному (гексадекан) та гідрофільному (етанол) субстратах, оцінка ролі біосурфактантів у складній системі взаємодій клітини з субстратом.

Вирощування бактерій проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу, г/л: KNO_3 — 1,0; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; рН 6,8 — 7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували гексадекан та етанол в концентрації 1 % (за об'ємом).

Як посівний матеріал використовували добову культуру *R. erythropolis* ЕК-1, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту (24 год), вирощену на рідкому середовищі з 0,3 % (за об'ємом) етанолу. В останньому варіанті кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 250 та 750 мл з 100 мл середовища на качалці при температурі 30 °С упродовж 168 годин.

Для визначення впливу різних режимів масообміну на синтез ПАР бактерії вирощували в таких умовах: 1) швидкість перемішування 150 об⁻¹, колби об'ємом 250 мл з 100 мл середовища; 2) швидкість перемішування 320 об⁻¹, колби об'ємом 750 мл з 100 мл середовища. Массообмінні характеристики систем, в яких здійснювалося культивування бактерій, оцінювали за сульфітним числом K_s , яке визначали за методикою, описаною в роботі [3].

У процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 кожні 24 год відбирали зразки культуральної рідини, для яких визначали: концентрацію біомаси, рН, поверхневий натяг, умовну концентрацію ПАР, емульгувальну активність.

Біомасу визначали за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху вагу за калібрувальним графіком (у разі гомогенної суспензії) або ваговим методом (у разі утворення

конгломератів клітин). Визначаючи біомасу ваговим методом, культуральну рідину, що містила залишки гексадекану, двічі відмивали гексаном (для вилучення гексадекану). Необхідність цієї операції зумовлена співсадженням частини гексадекану з клітинами, що призводить до суттєвого завищення концентрації біомаси.

Рівень синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1) поверхневий натяг вільної від клітин культуральної рідини σ , визначали за методом Вільгельмі [1] з використанням скляної пластинки. Значення σ є якісним показником, що свідчить про наявність ПАР у культуральній рідині. Перед визначенням σ супернатант культуральної рідини попередньо відмивали гексаном від залишків гексадекану, якому притаманні поверхнево-активні властивості, а його присутність призводить до заниження реального значення поверхневого натягу;

2) показник, названий нами "умовна концентрація ПАР", для оцінки кількісного вмісту ПАР в культуральній рідині. Цей показник визначається як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зниження поверхневого натягу на кривій залежності σ від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР. Умовна концентрація ПАР виражається в безрозмірних одиницях і надалі буде позначатися як ПАР*;

3) емульгувальна активність (індекс емульгування) культуральної рідини, яку визначали за методом, описаним у роботі [5]. Як субстрати для емульгування використовували вазелінову та соняшникову олію. Емульгувальну активність визначали для нативної (вихідної) та розбавленої дистильованою водою в 10 та 50 разів культуральної рідини.

Раніше нами було показано [3], що штам *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами біосурфактанти з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями.

Синтез біосурфактантів при вирощуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі спостерігався вже на 24 год культивування (табл. 1), про що свідчило зниження поверхневого натягу культуральної рідини до 50,9 мН/м та значення показника ПАР*, який становив 0,5. Максимальне

Таблиця 1
Динаміка утворення поверхнево-активних речовин при рості *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі

Час росту, год	Поверхневий натяг, мН/м	ПАР*, ум. од.	рН _{серед.}	Концентрація біомаси, г/л	Індекс емульгування культуральної рідини, % (субстрат — вазелінова олія)		
					Без розбавлення	Розбавлення 1:9	Розбавлення 1:49
24	50,9	0,5	7,1	0,2	47,5	43,7	42,0
48	51,4	0,8	7,1	0,3	59,3	48,2	48,8
72	53,2	1,0	7,2	0,4	51,3	34,7	27,7
96	49,6	1,1	6,8	0,5	48,2	27,9	24,4
120	47,2	2,1	6,7	0,7	46,1	27,8	23,8
144	47,8	2,4	6,8	1,2	35,2	9,0	8,5
168	50,7	2,0	7,0	1,3	22,8	4,4	2,3

Примітка. Посівний матеріал вирощений на середовищі з етанолом.

значення умовної концентрації ПАР при культивуванні бактерій на етанолі досягало 2,4 і було зафіксовано наприкінці експоненційної фази росту (144 год).

Максимальний індекс емульгування культуральної рідини був зафіксований на 48 год культивування (див. табл. 1.) У подальшому спостерігали поступове зниження емульгувальної активності впродовж всього процесу культивування за одночасного підвищення концентрації ПАР. На нашу думку, це зумовлено тим, що етанол є гідрофільним субстратом, який не потребує попереднього емульгування при надходженні в клітину. З іншого боку, зниження емульгувальної активності може відбуватися за рахунок поступового зв'язування в комплекс синтезованого емульгатора з поверхнево-активними метаболітами іншої природи.

Зважаючи на те, що першою реакцією катаболізму вуглеводнів є їх окиснення до відповідних спиртів за участю кисню під дією ферментів монооксигеназ [6], рівень аерації (масообмін) є важливим фактором, що впливає на синтез ПАР при рості продуцента на гексадекані. Встановлено, що найвищі показники синтезу

ПАР були зафіксовані при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 в режимі масообміну, який відповідає сульфитному числу $K_2 = 0,14 \text{ г O}_2 / \text{л год}$ (таб. 2 і 3).

Максимальний індекс емульгування культуральної рідини спостерігався на 48 год вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані. Цікаво зазначити, що в процесі культивування продуцента підвищення показника ПАР* супроводжувалось різким зниженням емульгувальних властивостей культуральної рідини (див. табл. 2). З 120 год росту фіксували незначне зниження показника ПАР*, тоді як індекс емульгування підвищувався. Одержані дані можуть свідчити про те, що синтезовані емульгатори виступають у ролі своєрідних "каталізаторів" процесу асиміляції *n*-алканів. Відомо [4], що є два різних механізми транспорту алканів у клітину. Перший передбачає прямий контакт клітини з краплинами вуглеводнів. Його головними ознаками є висока клітинна гідрофобність, яка дає клітині змогу адгезуватися на алканах, та відсутність синтезу біосурфактантів. Другий механізм є біосурфактантопосередкованим, коли клітина контактує з емульгованим чи/і солюбілізованим поверхнево-активною речовиною вуглеводнем. Цей механізм характерний для гідрофільних клітин, здатних синтезувати ПАР.

Деякі мікроорганізми реалізують обидва механізми, тобто їм притаманна як висока гідрофобність клітинної поверхні, так і здатність до синтезу ПАР. До таких мікроорганізмів належить і селекціонований нами штам *R. erythropolis* ЕК-1, клітини якого мають гідрофобну природу і вже на першу добу культивування на гексадекані синтезують біосурфактанти. Відомо [7], що певна кількість синтезованих родококами ПАР залишається в асоційованому з клітинною стійкою стані. Ці речовини забезпечують гідрофобність клітинної поверхні, що в свою чергу полегшує процес адгезії мікроорганізмів на алкановій фракції та його подальший транспорт у клітину.

На основі одержаних експериментальних результатів нами була запропонована модель взаємодії клітин *R. erythropolis* ЕК-1 з гідрофобним субстратом. На початку культивування синтезований емульгатор розщеплює верхній шар алканової фракції на дрібні краплини. Потім починається синтез поверхнево-активних речовин, що супроводжується підвищенням показника ПАР*. Ці ПАР є відповідальними як за часткову солюбілізацію субстрату, так і за підвищення гідрофобності клітинної поверхні. Коли емульгована частина субстрату поглинається клітинами, процес синтезу емульгатора повторюється, про що свідчить повторне підвищення індексу емульгування. Надалі механізм поглинання вуглеводню меншою мірою залежить від процесу солюбілізації, спостерігається зниження рівня синтезу речовин з поверхнево-активними властивостями внаслідок підвищення гідрофобності клітинної поверхні, що дає змогу клітині "на пряму" контактувати з алканом.

Слід зазначити, що індекс емульгування розведеної у 10 і 50 разів культуральної рідини, отриманої після вирощування штаму на гексадекані, був здебільшого вищий, ніж для нативної (див. табл. 2 і 3). Це може відбуватися у результаті послідовного вивільнення у процесі розведення культуральної рідини певних угруповань комплексу емульгатор/ПАР, що відповідають за емульгування субстрату. При культивуванні продуцента на етанолі подібних залежностей не спостерігали (див. табл. 1). Навпаки, при розведенні культуральної рідини в 10 і 50 разів відбувалося зниження її емульгувальних властивостей.

Таблиця 2
Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані за високих значень K_2

Час росту, год	Поверхневий натяг, мН/м	ПАР*, ум. од.	рН _{відн}	Концентрація біомаси, г/л	Індекс емульгування культуральної рідини, % (субстрат — вазелінова олія)		
					Без розбавлення	Розбавлення 1:9	Розбавлення 1:49
24	32,0	0,4	8,4	0,3	49,2	20,4	49,7
48	48,5	0,9	8,5	0,4	58,7	22,3	39,5
72	54,5	1,0	8,5	0,5	37,1	46,7	46,8
96	45,7	2,7	8,7	0,8	25,6	27,3	40,8
120	39,4	2,5	8,3	1,2	39,7	39,7	42,1
144	37,7	2,4	7,8	1,4	39,2	32,6	43,4
168	38,4	2,4	7,3	1,5	32,5	32,7	43,5

Примітки: 1. $K_2 = 0,14 \text{ г O}_2 / \text{л год}$. 2. Посівний матеріал, вирощений на ГКА.

Таблиця 3
Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані за низьких значень K_2

Час росту, год	Поверхневий натяг, мН/м	ПАР*, ум. од.	рН _{відн}	Концентрація біомаси, г/л	Індекс емульгування культуральної рідини, % (субстрат — вазелінова олія)		
					Без розбавлення	Розбавлення 1:9	Розбавлення 1:49
24	42,1	0,4	8,4	0,3	43,7	45,0	55,3
48	47,4	1,0	8,1	0,6	60,1	43,9	44,5
72	47,8	1,1	7,8	0,9	53,6	56,5	57,1
96	47,5	2,2	7,7	1,1	51,9	70,3	70,9
120	41,5	1,8	7,7	1,7	53,8	70,2	71,8
144	43,3	1,1	7,6	2,2	46,2	52,9	56,0
168	42,5	0,9	7,6	2,2	46,2	63,1	68,7

Примітки: 1. $K_2 = 0,04 \text{ г O}_2 / \text{л год}$. 2. Посівний матеріал, вирощений на ГКА.

Висновки. У ході проведеної роботи досліджено закономірності синтезу ПАР під час вирощування штаму *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофільному та гідрофобному субстратах. Встановлено, що синтез біосурфактантів починається водночас з ростом продуцента, проте їх максимальна кількість накопичується у стаціонарній фазі. Обговорюється фізіологічне значення синтезу ПАР при рості бактерій на гексадекані та етанолі, зокрема запропоновано можливу модель взаємодії клітин *R. erythropolis* ЕК-1 з гідрофобним субстратом і розглянуто роль біосурфактантів у ній.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Райнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение. — Л.: Химия, 1988. — 200 с.

2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.В. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — № 5. — С.544 — 550.

3. Процессы и аппараты пищевых производств. Лабораторный практикум / Под общ. ред. В. Н. Стабникова — К.: Вища шк., 1986. — 175 с.

4. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // Journal of Appl. Microbiol. — 1999. — Vol. 86. — P. 421 — 423.

5. Cooper D.C., Goldenger B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. — 1987. — Vol. 53, № 2. — P. 224 — 229.

6. Geissdorfer W., Frosch S.C., Haspel G., Ehrt S., Hillen W. Two genes encoding proteins with similarities to rubredoxin and rubredoxin reductase are required for conversion of dodecane to lauric acid in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 // Microbiology. — 1995. — Vol. 141, № 5. — P. 1425 — 1432.

7. Lang S., Philp J.C. Surface-active lipids in rhodococci // Antonie van Leeuwenhoek. — 1998. — Vol. 74. — P. 59 — 70.

Надійшла до редколегії 14.06.05 р.