

Т.П. ПИРОГ, доктор біологічних наук

С.В. ІГНАТЕНКО

Д.О. ТАРАСЕНКО

Національний університет харчових технологій

## КЛЮЧОВІ ПРОБЛЕМИ ПРОМИСЛОВОГО ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

---

*Наведено літературні і власні експериментальні дані щодо стану і перспектив розвитку промислового виробництва мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) у світі. Зазначається, що висока на теперішній час собівартість мікробних ПАР зумовлена великими витратами на біосинтез і виділення цільового продукту, а також невисокою продуктивністю штамів-продуцентів. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими і пріоритетними у біотехнології мікробних ПАР.*

**Ключові слова:** *поверхнево-активні речовини, технологія біосинтезу, ефективність виробництва, промислові відходи, умови культивування, мікроорганізми-продуценти, виділення цільового продукту.*

*Представлены литературные и собственные экспериментальные данные, касающиеся состояния и перспектив развития промышленного производства микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) в мире. Отмечается, что высокая на сегодняшний день себестоимость микробных ПАВ обусловлена большими затратами на биосинтез и выделение целевого продукта, а также невысокой продуктивностью штаммов-продуцентов. Исследования, направленные на решение этих проблем, являются ключевыми и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ.*

**Ключевые слова:** *поверхностно-активные вещества, технология биосинтеза, эффективность производства, промышленные отходы, условия культивирования, микроорганизмы-продуценты, выделение целевого продукта.*

**М**ікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) використовуються у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоєфективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [1].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні до теперішнього часу не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [1].

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі:

© Т.П. Пирог, С.В. Игнатенко, Д.О. Тарасенко

використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості);

оптимізація умов культивування продуцента та пошук нових рентабельних методів виділення та очищення ПАР;

одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

На теперішній час дослідниками активно реалізуються перші два підходи, у той час як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР до недавнього часу не розглядалося як ефективний інструмент зниження собівартості виробництва мікробних ПАР.

### Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів поживного середовища становить близько 20—30 % загальних витрат на виробництво. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (оліежирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини).

У ряді робіт [4] було показано, що жири рослинного походження можуть використовуватися як ефективна та дешева сировина для синтезу ПАР. Так, соняшникова, соєва, рапсова, кукурудзяна олії можуть слугувати субстратами для синтезу рамноліпідів, софороліпідів, манозоліпідів (табл. 1). Проте ці сполуки є харчовою сировиною, що обмежує їх застосування у біотехнологічних процесах. З дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, касторова олія та олія жожоба.

Таблиця 1

#### Використання рослинних жирів для промислового отримання поверхнево-активних речовин

Субстрат	Поверхнево-активні речовини	Штам-продуцент	ПАР, г/л
Рапсова олія	Рамноліпід	<i>Pseudomonas species</i> DSM 2874	45
Кукурудзяна олія	Софороліпід	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	40
Соняшникова олія	Рамноліпід	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31
	Ліпопептиди	<i>Serratia marcescens</i>	—
	Рамноліпід	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	2,98
Соєва олія	Манозилерітри-толліпід	<i>Candida species</i> SY16	9,5

Примітка. «—» — дані відсутні.

Крім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Так, показана можливість викорис-

тання відходів виробництва соєвої та соняшникової олії для синтезу рамноліпідів штамми *Pseudomonas aeruginosa* AT10 та *P. aeruginosa* LB1. За присутності у середовищі культивування *Candida antarctica* та *C. apicola* відходів виробництва соняшникової олії кількість синтезованих гліколіпідів становила 10,5 та 13,4 г/л відповідно.

Промислові жиромісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також слугувати потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати є доступними у необхідних кількостях та дешевими, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази.

У літературі є повідомлення про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема, сироватки. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі з сирною сироваткою кількість синтезованих рамноліпідів становить 0,92 г/л, що перевищує показники синтезу ПАР на синтетичних середовищах. Використання сироватки як субстрату може вирішити проблему утилізації цього відходу молочної промисловості та суттєво знизити витрати на виробництво ПАР.

Як альтернативну сировину для виробництва ПАР також застосовують крохмалевмісні відходи. Так, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, які містять відходи картоплепереробних виробництв. Побічний продукт виробництва борошна з маніоки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 та *B. subtilis* LB5a [2]. За використання такого субстрату кількість ліпопептидів досягає 2,2—3,0 г/л. Субстратами для виробництва ПАР можуть слугувати такі крохмалевмісні речовини як рідкі відходи переробки рису, обробки злаків, патоки, кукурудзяного борошна.

Наші дослідження показали можливість використання для синтезу поверхнево-активних речовин гідрофільних субстратів (етанол, гліцерин), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони є водорозчинним і тому технологічнішими, по-друге, ці субстрати значно дешевші.

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* EK-1 і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах.

Слід зазначити, що бактерії родів *Rhodococcus* і *Acinetobacter* ростуть на етанолі, проте до теперішнього часу відсутні дані про синтез ними ПАР на цьому субстраті. Відомості про утворення поверхнево-активних речовин представниками роду *Nocardia* навіть на гідрофобних субстратах є дуже обмеженими.

Результати наших досліджень показали, що штам *R. erythropolis* EK-1 під час росту на етанолі

синтезує ПАР у незначних кількостях. Поверхневий натяг культуральної рідини (s) становив 50—55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР\*) досягала 1,1—1,2, а концентрація ПАР — 0,4—0,43 г/л, тоді як під час росту культури на гідрофобних субстратах ці показники були значно вищими. Подальші експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту на нітратне у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1, підвищення концентрації етанолу до 2 %, підтримання співвідношення вуглець/азот на рівні 36:1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР у три рази.

Максимальний синтез ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі (умовна концентрація ПАР 3,6; емульгувальна активність розбавленої у 50 раз культуральної рідини 96 %) спостерігався за наявності як джерела азоту у середовищі сечовини, а також дріжджового автолізу та мікроелементів, співвідношенні С/Н 60:1 і використанні інокуляту з кінця експоненційної фази росту у концентрації 10 %.

На теперішній час одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин — побічний продукт, утворюваний у великих кількостях при виробництві біодизелю з рослинної і тваринної сировини [5]. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансестерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [5]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на теперішній час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі. Одним із шляхів утилізації гліцерину може бути використання його як джерела вуглецю і енергії при розробці технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

Наші експерименти показали можливість синтезу ПАР у процесі вирощування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5 % гліцерину, в яких показники синтезу ПАР підвищувалися у кілька разів (неопубліковані дані). Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2 — 5,0 за наявності у середовищі іонів заліза і дріжджового автолізу, використанні інокуляту, вирощеного на гліцерині до середини експоненційної фази росту, тривалості культивування 168 год.

#### Ефективні і економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших факторів, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять приблизно 60 % загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості використовується ряд традиційних методів, зокрема,

кислотне осадження, екстракція органічними розчинниками, кристалізація, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо [1]. За останні роки було розроблено кілька нових методів для виділення позаклітинних ПАР: ультрафільтрація, сорбція на полістирольних матрицях та активованому вугіллі, іонообмінна хроматографія (табл. 2). Основною перевагою цих методів є можливість організації безперервного технологічного процесу та одержання високоочищених ПАР.

Таблиця 2

#### Вибір методу виділення поверхнево-активних речовин залежно від їх фізико-хімічних властивостей

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратне забезпечення	Переваги методу
Ультрафільтрація	Здатність ПАР формувати міцели, що затримуються полімерними мембранами	Ультрафільтраційний модуль, що містить полімерні пористі мембрани	Можливість проведення швидкої регенерації мембран, високий рівень чистоти отриманих препаратів
Адсорбція на полістирольних матрицях	Здатність до адсорбції ПАР на полімерних носіях з наступною десорбцією органічними розчинниками	Колонки, заповнені полістирольним носієм	Можливість проведення швидкої регенерації носія, високий рівень чистоти отриманих препаратів
Адсорбція на активованому вугіллі	Здатність ПАР адсорбуватися на активованому вугіллі та десорбуватися органічними розчинниками	Колонки, заповнені сорбційним матеріалом, або безпосереднє внесення вугілля в культуральну рідину	Можливість отримання високоочищених препаратів, швидка регенерація сорбенту, низька вартість
Іонообмінна хроматографія	Полярність молекули ПАР, що зумовлює здатність до обміну зарядженої його частини на рухомі йони катіонів та аніонів	Колонки, заповнені іонообмінною смолою	Можливість отримання високоочищених препаратів, багаторазове використання носія, швидкий процес регенерації

Слід зазначити, що у хроматографічних методах для здійснення процесів десорбції використовуються високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). За останні роки в промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метил-трет-бутилового етеру. Зокрема, така технологія застосовується для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*. Ці розчинники є дешевими і менш токсичними, що дає змогу суттєво скоротити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР та мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Ці переваги запропонованих розчинників

надають можливість створення на їх основі конкурентноздатніших технологій.

У ряді випадків використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому на теперішній час широко застосовуються багатоступеневі схеми, що включають кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від супутніх домішок. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти. Так, наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, характеризуються низькою вартістю і можуть використовуватися у нафтовидобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Натомість високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів. Така багатоступенева технологія повинна впроваджуватися на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектру галузей промисловості.

#### Мутантні і рекомбінантні штами — над синтетики поверхнево-активних речовин

Окрім оптимізації складу поживного середовища та умов культивування, вибору ефективного методу виділення цільового метаболіту, комерційна складова будь-якого біотехнологічного процесу залежить від потенційних можливостей штаму-продуцента. У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів, здатних до максимально повної трансформації субстратів у поверхнево-активні речовини. Використання таких «модифікованих» продуцентів дасть змогу підвищити ефективність технологічного процесу та одержувати ПАР із заданими властивостями. Для одержання надпродуцентів ПАР використовуються транспозони, іонізуюче випромінювання, хімічні мутагени типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, або процеси селекції на основі резистентності до іонних детергентів [3] тощо (табл. 3.)

Таблиця 3

#### Ефективність використання для синтезу поверхнево-активних речовин мутантних і рекомбінантних штамів

Мутантний (рекомбінантний) штамп	Спосіб одержання	Підвищення синтезу ПАР, %
1	2	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59C7	Введення транспозону Tn5-GM у <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC 1637	Обробка N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	900

Закінчення табл. 3

1	2	3
<i>Bacillus licheniformis</i> KGL11	Обробка N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	1100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 55033	Обробка N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	300 — 500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EBN-8	Дія -випромінювання на <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	100 — 200
<i>Bacillus subtilis</i> Suf-1	Дія ультрафіолету на <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	200 — 300
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Селекція на основі резистентності до катіонних детергентів	100 — 200

За останні роки було одержано ряд високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, з використанням як вектора плазмиди pC112 сконструйовано штамп *Bacillus subtilis* MI 113 введенням гену *lpa-14*, відповідального за синтез сурфактину. На середовищах із соєвим борошном рекомбінантний штамп синтезував у 8 разів більше сурфактину ніж вихідний. Створено ряд рекомбінантних штамів *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* — надсинтетиків рамноліпідів.

Застосування генно-інженерних методів дає змогу не тільки підвищити продуктивність штамів, а й змінювати хімічний склад синтезованих ними поверхнево-активних речовин. Так, зміна нуклеотидної послідовності гена, що кодує синтез сурфактину, супроводжувалась зміною складу ферментного комплексу і, як наслідок, синтезом нового ПАР (ліхенізин) штамом *Bacillus subtilis*.

Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* (продуцент рамноліпідів) не здатний використовувати для росту і біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гену *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штами, які синтезувати рамноліпіди на середовищі з молочною сироваткою.

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штамп *Gordonia amarae* введенням стійкого гену гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу у чотири рази підвищити синтез трегалозоліпідів.

**Висновки.** Отже, аналіз літературних і власних експериментальних даних показує, що організація промислового виробництва ПАР потребує попереднього ґрунтового вивчення економічної ефективності цього процесу. На теперішній час собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами за рахунок низького виходу цільового продукту та високих витрат на його виділення та очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу поживного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчастої схеми виділення ПАР може суттєво змінити існуючу ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умови використання нових штамів-надсинтетиків ПАР.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Desai J.D., Banat I.M.* Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1997. — Vol. 61, № 1. — P. 47 — 64.

2. *Nitschke M., Pastore G.* Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater // *Bioresour. Technol.* — 2006. — Vol. 97, № 2. — P. 336—341.

3. *Shabtai Y., Gutnick D.L.* Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resis-

tance to cetyltrimethylammonium bromide // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1986. — Vol. 52. — P. 146—151.

4. *Trummler, K., Effenberger F., Syldatk C.* An integrated microbial enzymatic process for production of rhamnolipids and l-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874 // *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* — 2003. — Vol. 105. — P. 563—571.

5. *Yazdani S.S., Gonzales R.* Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — Vol. 18. — P. 213—219.