

**МІНІСТЕРСТВО
ОСВІТИ І НАУКИ
України**



**НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



Харчова ПРОМИСЛОВІСТЬ

9



ВИДІЛЕННЯ АЦЕТОНО-БУТИЛОВИХ БАКТЕРІЙ З РІЗНИХ ПРИРОДНИХ ДЖЕРЕЛ

У ході проведених робіт були ізольовані ацетоно-бутилові бактерії з різних природних джерел. Визначена кількість синтезованого ними ацетону та здійснено порівняльний аналіз найбільш активних ізолятів ацетоно-бутилових бактерій.

Ключові слова: ацетоно-бутилові бактерії, ацетон

В ходе проведенных работ были изолированы ацетоно-бутиловые бактерии с разных природных источников. Определено количество синтезированного ими ацетона и проведен сравнительный анализ наиболее активных изолятов ацетоно-бутиловых бактерий.

Ключевые слова: ацетоно-бутиловые бактерии, ацетон

During the work stains of acetone-butanol bacteria were isolated from different natural sources (environments). It was evaluated an amount of acetone produced by bacteria. Comparative analysis of the most active acetone-butanol bacteria's stains was performed.

Keywords: acetone-butanol bacteria, acetone.

Дослідження ацетоно-бутилового бродіння було розпочато наприкінці XIX століття. Спочатку всі роботи мали чисто теоретичний характер. Практичне використання продуктів ацетоно-бутилового бродіння розпочалося у 1918 р., коли бутиловим спиртом зацікавились як сировиною для отримання каучука. Другий продукт бродіння — ацетон почали використовувати в період першої світової війни для виробництва вибухових речовин. Мікробіологічне одержання ацетону було при-

зупинене у 80-х роках минулого століття у зв'язку з переходом на хімічний синтез даної сполуки [1].

У харчовій промисловості ацетон використовується як екстрагент при виробництві різноманітних продуктів. Зокрема його використовують для екстракції кофеїну із кавових зерен, виділення жирів, вітамінів та біологічно активних сполук із рослинної та тваринної сировини [2].

Нинішнє збільшення цін на нафту, продукти переробки якої є основною сировиною для вироб-

© О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, С.О. Скроцький,
М.М. Гавриленко, Г.Ф. Смірнова, 2010

ництва ацетону, вимагає переходу на дешевші джерела отримання хімічних сполук, зокрема ацетону. Таким є виробництво біоацетону на відходах харчової промисловості з використанням ацетонобутилових бактерій (АББ).

Метою даної роботи було вивчення розповсюдження АББ у різних природних і виробничих субстратах для визначення найбільш вірогідних джерел отримання цих бактерій та селекціонування активних штамів АББ для промислового виробництва ацетону.

Для виділення АББ використовували зразки ґрунту та ризосфери рослин відібрані з болотистої місцевості міста Києва та приміських районів, мул озер та річок, активний мул очисних споруд, гній великої рогатої худоби та курячий послід. Всього для дослідження було відібрано 86 зразків.

Для виділення АББ використовували картопляне середовище наступного складу (г/л): картопля — 200,0; глюкоза — 5,0; сульфат амонію — 1,0; карбонат кальцію — 3,0; водопровідна вода [3]. Зразки розводили у стерильній водопровідній воді і для знищення вегетативних форм клітин прогрівали при 80 °С 25 хв. Після цього зразки висівали на стерильне середовище, яке було розлите високим стовпчиком у пробірки. Для позбавлення розчиненого кисню поживне середовище попередньо кип'ятили. На засіяні зразки нашаровували вазелінове масло для запобігання дифузії кисню у середовище.

Попередній відбір АББ проводили візуально за такими критеріями: а) виділення вуглекислого газу, в) розрідження середовища, с) загальне освітлення середовища.

Вторинний відбір АББ проводили по наявності ацетону. Для цього використовували якісну реакцію на ацетон, яка ґрунтується на взаємодії фенілгідразинів з кетонами, з утворенням фенілгідразонів. При наявності ацетону у досліджуваному зразку випадає білий осад [4].

Позитивні, по якісній реакції зразки, використовували для кількісного визначення ацетону. Він полягає у тому, що в лужному середовищі із ацетону та йоду утворюється йодоформ [4]. Йод, який не вступив у реакцію відтитрували 0,1 М розчином тіосульфату натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Розчинений ацетон визначали у культуральній рідині. За різницею, тіосульфату, що пішов на титрування контрольного і дослідного зразку визначали кількість йоду, який вступив у реакцію. Вміст ацетону розраховували за формулою:

$$(A - B) \cdot 0,9765, \text{ мг/мл,}$$

де А — об'єм 0,1 М тіосульфату, що пішов на титрування контрольного зразку (стерильне поживне середовище), мл; В — об'єм 0,1 М тіосульфату, що пішов на титрування дослідного зразку, мл; 0,9765 — кількість ацетону, яка відповідає 1 мл 0,1 М розчину тіосульфату, що пішов на титрування, мг [1].

З активних накопичувальних культур АББ ізолювали чисті культури, використовуючи синтетичне напіврідке агаризоване середовище на основі розчинного крохмалю наступного складу (г/л): пептон — 10,0; дріжджовий екстракт — 3,0; розчинний крохмаль — 1,0; хлорид натрію — 5,0; гідрохлорид цистеїну — 0,5; глюкоза — 5,0; ортовокислий натрій — 3,0; агар — 5,0; вода дистильована [5].

У розтитровані зразки вносили тепле напіврідке поживне середовище і переносили зразки у стерильні піпетки Пастера. Після чого кінці піпеток обробляли теплою сумішшю вазеліну з парафіном (1:1) для запобігання висихання культури та надходження кисню. Для подальшої роботи відбирали зразки з вираженими ознаками ацетоно-бутилового бродіння (просвітління середовища навколо колонії АББ та появи пухирця газу над колонією АББ).

В ході проведених робіт було перевірено 86 зразків з різних природних ніш (табл. 1).

Таблиця 1
Розповсюдження продуцентів ацетону у різних природних нішах

№ п/п	Місце відбору проби	Кількість відібраних зразків	Кількість зразків з позитивною реакцією на ацетон	Відношення зразків з позитивною реакцією на ацетон до відібраних зразків, %
1	Ґрунт хвойного лісу	18	3	16
2	Ґрунт змішаного лісу	14	3	21
3	Ґрунт польовий (чорнозем)	5	4	80
4	Мул р. Дніпро	5	2	40
5	Мул о. Супій	4	4	100
6	Торф	7	5	71
7	Пісок кар'єрний	5	2	40
8	Гній коров'ячий	3	3	100
9	Послід курячий	4	4	100
10	Активний мул водоочисних споруд	3	2	66
11	Міське звалище	6	3	50
12	Жомові ями (цукровий завод)	5	3	60
13	Мул лісового озера	2	—	0
14	Пісок річковий	5	—	0

З табл. 1 видно, що всі зразки відібрані з озера Супій, коров'ячого гною та курячого посліду були позитивними по здатності до синтезу ацетону. При дослідженні зразків відібраних з лісового озера та річкового піску не спостерігалось бродіння і вони давали негативну реакцію на ацетон. Було протестовано достатньо велику кількість зразків з ґрунту хвойного та змішаного лісу, але лише 20 % вказаних зразків дали позитивний результат. Загалом 44 % відібраних ізолятів давали позитивну реакцію на ацетон. При подальших пасажах близько 3 % виділених АББ втрачали властивість до синтезу ацетону.

У стабільно позитивних ізолятів було проведено кількісне визначення ацетону та порівняльний аналіз найбільш активних (по ацетону) ізолятів з різних природних ніш (табл. 2). Було встановлено, що 22 % стабільно позитивних по синтезу ацетону штамів АББ продукували розчинник у кількості від 4,0 до 5,0 г/л. Штами АББ виділені з ґрунту хвойного та змішаного лісу, активного мулу водоочисних споруд, міського звалища та жомових ям продукували невелику кількість ацетону (у межах 0,8 – 2,1 г/л). Найбільш активні по кількості синтезованого ацетону штами АББ були виділені з польового ґрунту, мулу озера Супій, торфу, кар'єрного піску та курячого посліду.

Таблиця 2

Продуктування ацетону штамами АББ, виділеними з різних природних ніш

№ п/п	Місце відбору проби	Активні по ацетону штами АББ	Концентрація ацетону, г/л
1	Ґрунт хвойного лісу	г.х.л. 7	0,8
		г.х.л. 12	1,1
		г.х.л. 13	1,2
2	Ґрунт змішаного лісу	г.з.л. 4	1,0
		г.з.л. 8	1,2
		г.з.л. 14	1,3
3	Ґрунт польовий (чорнозем)	г.п. 1	3,0
		г.п. 2	3,5
		г.п. 3	4,2
		г.п. 4	4,5
4	Мул р. Дніпро	м.р. 1	2,2
		м.р. 4	3,2
5	Мул о. Супій	м.о.с. 1	2,5
		м.о.с. 2	3,3
		м.о.с. 3	2,7
		м.о.с. 4	4,1
6	Торф	т. 1	2,2
		т. 2	3,5
		т. 3	4,0
		т. 4	4,7
		т. 5	5,0
7	Пісок кар'єрний	п.к. 1	1,5
		п.к. 4	4,0
8	Гній коров'ячий	гв.к. 1	1,3
		гв.к. 2	2,0
		гв.к. 3	1,5
9	Послід курячий	п.к. 1	2,8
		п.к. 2	4,0
		п.к. 3	3,4
		п.к. 4	3,5
10	Активний мул водоочисних споруд	а.м. 1	1,2
		а.м. 3	2,1
11	Міське звалище	м.з. 1	1,8
		м.з. 4	1,1
		м.з. 5	1,6
12	Жомові ями (цукровий завод)	ж.я. 1	1,5
		ж.я. 3	1,5

Продуктори ацетону в основному були виділені з тих природних джерел, які містили у достатній кількості органічні речовини. Однак, ми звернули увагу, що наявність значної кількості продуцентів у тому чи іншому природному джерелі не завжди корелює з наявністю активних штамів. Тому була проведена порівняльна характеристика актив-

ності штамів АББ, виділених з різних природних ніш. Ізоляти знаходились в однакових умовах і культивувались на однаковому середовищі (8 % кукурудзяний затер). Перевірялись усі позитивні по ацетону зразки. До уваги брали середні показники АББ виділених з різних природних джерел (табл. 3).

Таблиця 3

Активність бродіння ацетоно-бутилових бактерій виділених з різних природних джерел

№ п/п	Місце відбору проби	Час початку бродіння, год	Перехід у другу фазу бродіння, год	Кількість ацетону, г/л	Загальна тривалість бродіння, год
1	Ґрунт хвойного лісу	7,0	10,2	1,03	56
2	Ґрунт змішаного лісу	6,6	9,1	1,16	52
3	Ґрунт польовий (чорнозем)	4,5	7,0	3,80	48
4	Мул р. Дніпро	5,7	8,2	2,70	50
5	Мул о. Супій	5,0	6,7	3,00	50
6	Торф	4,2	7,0	3,90	46
7	Пісок кар'єрний	5,6	8,1	2,70	52
8	Гній коров'ячий	5,2	7,5	1,70	48
9	Послід курячий	5,1	6,3	3,30	47
10	Активний мул водоочисних споруд	6,0	10,1	1,65	55
11	Міське звалище	5,6	9,0	1,50	58
12	Жомові ями (цукровий завод)	6,3	9,2	1,40	60

Отже найбільш активні продуценти ацетону були ізолювані з торфу, мулу озера Супій, польового ґрунту та курячого посліду. АББ виділені із торфу та польового ґрунту продукували ацетон у кількості 3,8 – 3,9 г/л, продуценти ацетону виділені із курячого посліду та мулу озера Супій продукували ацетон на 25 % менше. Інші виділені штами АББ синтезували ацетон у менших кількостях (від 1,0 до 2,7 г/л). Таким чином досліджувані штами АББ є перспективними для подальшого вивчення та оптимізації умов їх культивування для збільшення виходу ацетону.

Висновки. У результаті проведених досліджень ізолювано 8 активних штамів ацетоно-бутилових бактерій. Найбільшу кількість ізолятів виділено із торфу та польового ґрунту. Встановлено, що продукція ацетону даними штамами АББ становить від 4,0 до 5,0 г/л. Враховуючи велику вартість ацетону як розчинника, доцільним є проведення подальших досліджень у даному напрямку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Логоткин И.С. Технология ацетоно-бутилового производства. — М.: Пищепромиздат, 1958. — 267 с.
2. Климова Е.В. Использование смеси растворителей ацетон-трихлорэтилен для экстракции оливкового масла

ТЕХНОЛОГІЯ

из жмыха; жирно-кислотный состав получаемого масла // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. — 2008. — № 3. — С. 956.

3. Антупчук А.Ф., Кірсева І.Ю. Водна мікробіологія. — К.: Видавничий центр НАУ, 2003. — 224 с.

4. Ким А.М. Органическая химия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002. — 971 с.

5. Montoya D., Spitia S., Silva E., Schwarz H.W. Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis // Journal of Biotechnology. — 2000. — Vol 79. — P. 117 – 126.

Одержана редколлегиею 26.02.2010

УДК 579.841:577.114

Т.П. ПИРОГ, д-р біол. наук

О.М. САВЧУК, студ.

Ф.В. МУЧНИК, канд. біол. наук

Національний університет харчових технологій