

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог, д-р біол. наук
С.І. Антонюк, асп.
М.О. Шулякова, студ.
Ф.В. Мучник, канд. біол. наук
Національний університет
харчових технологій

**ГЛІЦЕРИН ЯК СУБСТРАТ
ДЛЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-
АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ACINETOBACTER CALCOACETICUS
IMB B-7241**

Встановлено можливість використання гліцерину — побічного продукту виробництва біодизелю як джерела вуглецю і енергії для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. Максимальні показники синтезу ПАР (умовна концентрація ПАР до 3,3) на середовищі з 1,0 % гліцерину спостерігалися за наявності у середовищі дріжджового автолізу та мікроелементів. Встановлено інгібувальний вплив катіонів заліза на синтез ПАР штамом IMB B-7241.

Одержані дані є вихідними для розробки технології синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, які можуть бути використані у різних галузях промисловості та природоохоронних технологіях.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, культивування, біосинтез, промислові відходи, гліцерин, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241

Унікальні властивості мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) дають змогу використовувати їх у різних галузях промисловості: нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій, сільському господарстві і природоохоронних біотехнологіях для очищення довкілля від вуглеводнів, важких металів та інших ксенобіотиків [4]. Доцільність практичного використання ПАР залежить передусім від економічної ефективності їх виробництва. Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів поживного середовища становить до 70 % загальних витрат на виробництво [5]. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої сировини, а також промислових відходів.

У зв'язку із зростанням обсягів виробництва біодизелю у світі виникає проблема утилізації гліцерину — побічного продукту трансестерифікації рослинних олій чи тваринних жирів, причому на кожні 100 літрів біодизелю утворюється майже стільки ж літрів технічного гліцерину [3]. Тільки за період з 2004 по 2006 р. ціна на гліцерин знизилась більш ніж у 10 разів [3].

Це зумовило серйозні зміни в багатьох галузях промисловості, наприклад, Procter and Gamble перестали виробляти власний гліцерин, як і багато інших косметичних компаній. Тому переробка технічного гліцерину в більш цінні продукти є актуальною задачею сьогодення [3].

Деякі стратегії базуються на хімічній та біологічній переробці гліцерину. Біологічна модифікація допомагає обійти недоліки хімічного каталізу (низька специфічність, використання високих тисків і температур) виробляючи при цьому велику кількість різноманітних практично цінних продуктів, у тому числі й мікробних поверхнево-активних речовин.

У попередніх дослідженнях нами було встановлено можливість використання гліцерину як субстрату для синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями штамом *Nocardia vaccinii* K-8 [1]. Інший штам

© Т.П. Пирог, С.І. Антонюк, М.О. Шулякова, Ф.В. Мучник, 2012

Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує поверхнево-активні речовини за умов росту на гідрофільних (етанол, глюкоза) і гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) субстратах [2].

Мета даної роботи — дослідити можливість синтезу поверхнево-активних за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з гліцерином.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; рН 6,8-7,0. У середовище додатково вносили (окремо і у різних комбінаціях) дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів [2] — 0,1 % (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 г/л. Розчин мікроелементів містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; H_3BO_3 — 0,006; KI — 0,0001; ЕДТА (Трилон В) — 0,5.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин у концентрації 1,0 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з середини експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного вище складу з 0,5 % гліцерину (без дріжджового автолізату і мікроелементів). В одному з варіантів у середовище для одержання інокуляту вносили $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 г/л. 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°C.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР*, індекс емульгування E_{24}) визначали як описано раніше [1, 2].

Попередні дослідження показали, що за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі показники синтезу ПАР підвищувалися за наявності у поживному середовищі дріжджового автолізату і мікроелементів [2]. Тому на першому етапі досліджували особливості синтезу поверхнево-активних речовин у процесі культивування штаму IMB B-7241 на середовищі з гліцерином, в яке добавляли (окремо і разом) дріжджовий автолізат, мікроелементи і сульфат заліза. Дослідження ролі $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у синтезі ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 було зумовлене тим, що за присутності сульфату заліза у середовищі з гліцерином спостерігали максимальні показники синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8. Зазначимо, що суттєве підвищення синтезу ПАР штамом К-8 на гліцерині мало місце у разі внесення $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у середовище як для одержання інокуляту, так і для синтезу поверхнево-активних речовин. У зв'язку з цим у перших експериментах посівний матеріал *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували на середовищі з сульфатом заліза.

Для визначення потреб мікроорганізмів у факторах росту чи мікроелементах зазвичай використовують посівний матеріал, вирощений на «голодному» середовищі (без факторів росту і мікроелементів), або здійснюють кілька послідовних пересівів на відповідних середовищах з певними факторами росту. У своїх дослідженнях ми використовували другий підхід, аналізуючи показники синтезу ПАР упродовж трьох пересівів штаму IMB B-7241 на середовищі з гліцерином, дріжджовим автолізатом, мікроелементами і сульфатом заліза (табл. 1).

Як видно з наведених у табл. 1 даних, найвищий показник умовної концентрації ПАР (2,6–2,8) спостерігався за присутності у середовищі з гліцерином тільки дріжджового автолізату. Зазначимо, що для всіх досліджуваних варіантів показники синтезу ПАР знижувалися упродовж послідовних пересівів, а присутність у середовищі сульфату заліза призводила до суттєвого зниження показника умовної концентрації поверхнево-активних речовин. За умов росту штаму IMB B-7241 на середовищі без дріжджового автолізату, мікроелементів і сульфату заліза показник умовної концентрації поверхнево-активних речовин не перевищував 1,5–1,6, а індекс емульгування — 35–40 %. Причому у процесі культивування бактерій на середовищі,

що містило $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, спостерігали підвищення на 30–40 % концентрації біомаси порівняно з вирощуванням *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на середовищі без сульфату заліза. Отже, за присутності у середовищі з гліцерином $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ має місце інгібування тільки синтезу поверхнево-активних речовин.

У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували синтез поверхнево-активних за умов росту штаму IMB В-7241 на гліцерині з використанням посівного матеріалу, вирощеного на середовищі без сульфату заліза (табл. 2). Як видно з наведених у табл. 2 даних, у разі виключення $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ зі складу середовища для одержання інокуляту спостерігали підвищення показників синтезу ПАР, причому навіть після третього пересіву показники ПАР* залишалися вищими порівняно з такими за умови використання посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з сульфатом заліза (див. табл. 1 і 2). Зазначимо, що незалежно від способу підготовки інокуляту показники синтезу ПАР за умов росту штаму IMB В-7241 на середовищі, що містило $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, були нижчими, ніж під час культивування бактерій на середовищі без сульфату заліза.

*Таблиця 1. Вплив дріжджового автолізату, мікроелементів і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на гліцерині (1 %)*

Наявність у середовищі			Показники синтезу ПАР упродовж пересіву			
дріжджового автолізату	мікроелементів	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Умовна концентрація ПАР (ПАР*)		Індекс емульгування, E_{24} , %	
			I	III	I	III
+	+	–	2,4±0,12	1,8±0,09	77±4	55±2
–	+	–	2,1±0,10	2,0±0,10	67±3	61±3
+	–	–	2,8±0,14	2,6±0,13	70±4	60±3
–	–	+	1,8±0,09	1,4±0,07	53±2	46±2
+	+	+	1,9±0,09	1,8±0,09	51±2	45±2
–	+	+	1,7±0,08	1,5±0,07	55±2	49±2
+	–	+	1,6±0,08	1,6±0,08	53±2	47±2

П р и м і т к а. Концентрації дріжджового автолізату, мікроелементів і сульфату заліза наведено у тексті статті. I і III — перший і третій пересіви бактерій на відповідні середовища. Посівний матеріал вирощений на середовищі з 0,5 % гліцерину і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Найвище значення показника умовної концентрації ПАР (3,2–3,3) зафіксовано у процесі вирощування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на середовищі з гліцерином, дріжджовим автолізатом і мікроелементами (табл. 2). Раніше [2] нами було показано, що й за умов росту штаму IMB В-7241 на етанолі внесення у середовище дріжджового автолізату і мікроелементів супроводжувалось підвищенням показників синтезу ПАР.

Проте слід зазначити, що під час вирощування штаму IMB В-7241 на етанолі показник умовної концентрації ПАР досягав значення 3,9 [2] і був вищим, ніж у процесі культивування бактерій на гліцерині (див. табл. 2). На нашу думку, це може бути зумовлено різною концентрацією вуглецю у середовищі культивування. Так, за концентрації 1 % гліцерину (об'ємна частка) вміст вуглецю у середовищі становить 4,93 г/л, а за концентрації 2 % етанолу (об'ємна частка) — 8,34 г/л. Отже, незважаючи на нижче значення показника ПАР* на середовищі з гліцерином, ефективність трансформації вуглецю субстрату у поверхнево-активні речовини є вищою, ніж на етанолі. Зазначимо, що коректніші висновки про ступінь конверсії вуглецю субстратів у ПАР можна буде зробити після визначення кількості синтезованих поверхнево-активних речовин у г/л.

Однією з причин інгібування синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 за внесення у середовище сульфату заліза може бути наявність цієї солі у складі мікроелементів, а також і у дріжджовому автолізаті. Проте зниження показників

синтезу ПАР (але не біомаси) за умов росту штаму ІМВ В-7241 на середовищі з $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ без дріжджового автолізату і мікроелементів може свідчити про те, що катіони заліза є інгібіторами ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Виясненню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Таблиця 2. Синтез ПАР за умов росту A. calcoaceticus ІМВ В-7241 на гліцерині (1 %) з використанням інокуляту, вирощеного на середовищі без сульфату заліза

Наявність у середовищі культивування			Умовна концентрація ПАР упродовж пересіву	
дріжджового автолізату	мікроелементів	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	I	III
+	+	-	3,2±0,16	3,3±0,16
-	+	-	2,6±0,13	2,7±0,13
+	-	-	2,6±0,13	2,5±0,12
-	-	+	2,0±0,10	1,7±0,08
+	+	+	2,6±0,13	2,3±0,11
-	+	+	2,1±0,10	1,9±0,09
+	-	+	2,2±0,11	1,8±0,09

П р и м і т к а. Концентрації дріжджового автолізату, мікроелементів і сульфату заліза наведено у тексті статті. I і III — перший і третій пересіви бактерій на відповідні середовища. Посівний матеріал вирощений на середовищі з 0,5 % гліцерину без $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що за внесення у середовище з гліцерином (1 %) дріжджового автолізату і мікроелементів умовна концентрація поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 підвищувалася у два рази (до 3,2–3,3). За наявності у середовищі для одержання інокуляту і культивування бактерій сульфату заліза спостерігали зниження показників синтезу ПАР.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині // Наукові праці НУХТ. — 2008. — № 25, Ч. I. — С. 107–109.
2. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 304–310.
3. Paulo G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Advanc. — 2009. — V. 27. — P. 30–39.
4. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. — 2007. — V. 25. — P. 99–121.
5. Willke Th., Vorlop K.-D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — V. 66. — P. 131–142.

**Т.П. Пирог, С.И. Антонюк,
М.А. Шулякова, Ф.В. Мучник**

**Глицерин как субстрат для синтеза поверхностно-активных веществ
Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241**

*Установлена возможность использования глицерина - побочного продукта производства биодизеля в качестве источника углерода и энергии для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241. Максимальные показатели синтеза ПАВ (условная концентрация ПАВ до 3,3) на среде с 1,0 % глицерина наблюдались при наличии в среде дрожжевого автолизата и микроэлементов. Установлено ингибирующее влияние катионов железа на синтез ПАВ штаммом ИМВ В-7241.*

*Полученные данные являются исходными для разработки технологии синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, которые могут быть использованы в различных отраслях промышленности и природоохранных технологиях.*

*Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, культивирование, биосинтез, промышленные отходы, глицерин, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241*

**T. Pyrog, S. Antoniuk,
M. Shuliakova, F. Muchnyk**

**Glycerol as substrate for synthesis of surface-active substances
of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241**

*The possibility of using of glycerol, that is a co-product generated during biodiesel production as substrate for surface active substances (SAS) synthesis by strain *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 has been determined. Maximal characteristics of SAS synthesis (conditional concentration of SAS up to 3,3) on glycerol (1,0 %) were observed in the presence of yeast autolysate and microelements in the medium. It has been determined that iron cations inhibit the SAS synthesis by the strain IMV B-7241.*

*The data obtained are basic for the development of the technology of SAS synthesis by strain *A. calcoaceticus* IMV B-7241 that can be used in different industries and nature-conservative technologies.*

*Key words: surface active substances, cultivation, biosynthesis, industrial waste, glycerol, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241*

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 21.12.2010 р.