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 *RHODOCOCCUS 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 pH 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): $NaNO_3$ — 1,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1; NaCl — 0,1; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 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 Р/О [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 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку) та дигідроксиацетонкінази (активність 288 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку), а також через гліцерол-3-фосфат за участю гліцеринкінази (активність 800 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку) та гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (активність 108 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку) [5].

Раніше було встановлено [2, 3], що у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 функціонує повний цикл трикарбонових кислот, однак низька активність 2-оксоглутаратдегідрогенази (активність 10-20 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$·білка) свідчить, що ЦТК виконує переважно біосинтетичну роль; поповнення пулу C_4-дикарбонових кислот здійснюється у гліоксилатному циклі (активність ізоцитратліази і малатсинтази 730—740 і 137—165 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку відповідно). У синтезі вуглеводів беруть участь обидва ключові ферменти глюконеогенезу: ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза (203—603 і 556—943 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку відповідно). Ензиматичні дослідження також підтвердили здатність штаму IMB Ac-5017 до синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів (активність трегалозофосфатсинтази 66—679 нмоль·хв$^{-1}$·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 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-

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 (*рисунок*), по одному моль АТФ витрачається на утворення дигідроксиацетонфосфату та 1,3-дифосфогліцерату, по два моля АТФ — на синтез ФЕП та триозофосфату при глюконеогенезі. Оскільки для утворення однієї молекули трегалози потрібно чотири молекули фосфогліцерату, на синтез яких необхідно 8 молекул гліцерину, то витрата енергії складе 28 АТФ. Крім того, один моль АТФ використовується при утворенні нуклеозиддифосфатсахариду (глюкозо-6-фосфат → УДФ-глюкоза). Таким чином, енергетичні потреби на синтез треголозо-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_2 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 $CH_3 — (CH_2)_4 — CO — SKoA$. В наступному циклі утворюється $CH_3 — (CH_2)_6 — CO — SKoA$. 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_{34} — кислоти необхідно 17 моль ацетил-КоА, на синтез яких з гліцерину витратиться 17 моль АТФ, енергетичні витрати при синтезі однієї молекули міколової кислоти складуть 16 + 17 = 33 моль АТФ.

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

$$\text{Гліцерин} \rightarrow \text{Ацетил-КоА} + \text{АТФ} + 2\text{НАДН} \qquad (1)$$

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

$$17\text{Гліцерин} \rightarrow 17\text{Ацетил-КоА} + 17\text{АТФ} + 34\text{НАДН} \qquad (2)$$

та 8 моль — для синтезу трегалозофосфату:

$$8\ \text{Гліцерин} \rightarrow 8\text{Ацетил-КоА} + 8\text{АТФ} + 12\ \text{НАДН} + 4\ \text{ФАДН} \qquad (3)$$

запишемо рівняння (1) наступним чином:

$$25\text{Гліцерин} \rightarrow 25\text{Ацетил-КоА} + 25\text{АТФ} + 50\text{НАДН} + 4\ \text{ФАДН} \qquad (4)$$

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* IMB Ac-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

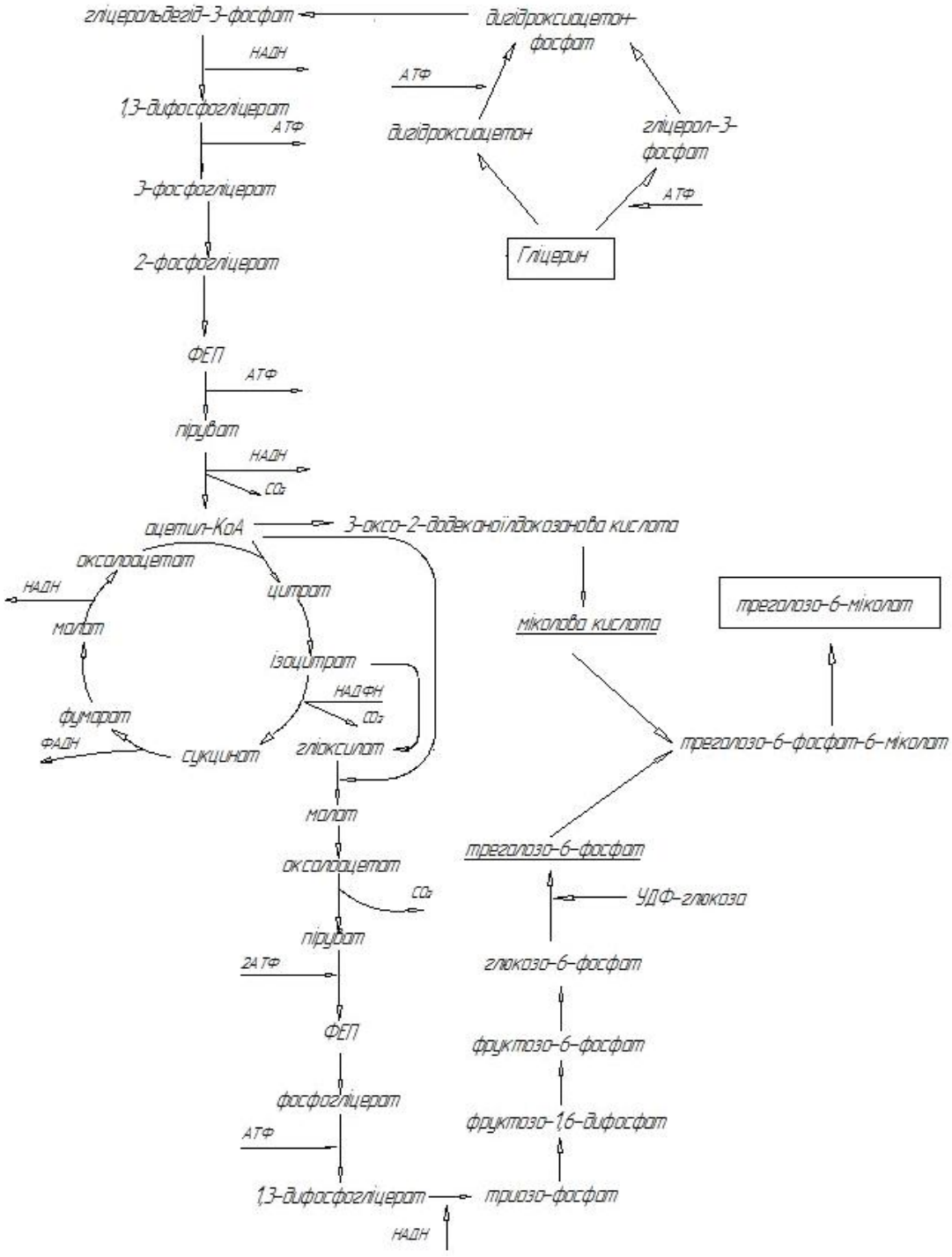

Схема синтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гліцерині

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]:

$$4\text{ФГК} + NH_3 + 29\text{АТФ} + 5{,}5\text{НАД(Ф)Н} \rightarrow (C_4H_8O_2N) \qquad (5)$$

Сумарні реакції перетворення гліцерину та гексадекану в ФГК:

Гліцерин → ФГК + НАД(Ф)Н (6)

Гексадекан + 5АТФ → 4ФГК + 16НАД(Ф)Н + 11$ФАДН_2$ + CO_2 (7)

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

Гліцерин → ФГК + 2АТФ (8)

Гексадекан → 4ФГК + 38АТФ (9)

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* IMB Ac-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* IMB Ac-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* IMB Ac-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* IMB Ac-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* IMB Ac-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, очевидною 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 ПАР від співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші та підтверджено, що теоретично розраховане молярне співвідношення гексадекану і гліцерину 1:7 є оптимальним для синтезу ПАР 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* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с гліцерином / 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* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ 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 игексадекана для синтеза поверхносно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017

Теоретический расчет энергетических потребностей синтеза трегалозомиколатов Rhodococcus erythropolis ИМВ 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 гексадекане и глицерине соответственно. Полученные данные являются исходными для разработки технологии синтеза ПАВ R. erythropolis ИМВ Ас-5017, которые могут быть использованы в различных отраслях промышленности и природоохранных технологиях.

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, культивирование, Rhodococcus erythropolis ИМВ 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* IMV Ac-5017

Energy and biochemical aspects of synthesis of biosurfactants by Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017 on the mixture of hexadecane and glycerol were considered. Theoretical calculation of energy needs for trehalosemicolates synthesis by strain IMV Ac-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

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.