

УДК 759.873.088.5:661.185

МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 НА ГЕКСАДЕКАНЕ

© 2011 г. Т. П. Пирог*, С. В. Игнатенко**

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

**Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Поступила в редакцию 08.09.2010 г.

Исследованы особенности синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при периодическом культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 на среде с н-гексадеканом. Максимальные показатели синтеза ПАВ (концентрация внеклеточных ПАВ – 7.2 г/л, индекс эмульгирования культуральной жидкости – 50%, выход ПАВ 50% от субстрата) наблюдались при концентрации растворенного кислорода 60–70% от насыщения, pH 8.0, дробной подаче субстрата порциями по 0.3–0.4% каждые 5–6 ч до конечной концентрации 2.4% и использовании 10% инокулята, выращенного до середины экспоненциальной фазы на среде с 1.0% н-гексадекана. Реализация процесса биосинтеза ПАВ на ферментационном оборудовании дала возможность повысить почти в 2 раза количество синтезированных ПАВ и сократить в 3.5 раза длительность культивирования продуцента по сравнению с выращиванием в колбах на качалке.

Из загрязненных нефтью образцов почвы нами выделен штамм нефтеокисляющих бактерий, идентифицированный как *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 [1]. Установлена возможность очистки воды от нефти (100 мг/л) иммобилизованными на керамзитовыми клетками *R. erythropolis* ЭК-1 [1] и интенсификации процесса деградации нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма ЭК-1 [2]. Показано, что при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах *R. erythropolis* ЭК-1 образует поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые по химической природе являются комплексом нейтральных липидов и гликолипидов (трегалозомоно- и димиколаты) [3]. Изучение особенностей метаболизма н-гексадекана у штамма ЭК-1 позволило установить условия культивирования бактерий, обеспечивающих повышение синтеза ПАВ [4]. Так, снижение в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 концентрации катионов калия (ингибиторы алкангидроксилазы и НАДФ⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы), повышение содержания катионов натрия (активаторы этих ферментов) и железа, необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увеличением активности ферментов метаболизма н-гексадекана, а также повышением в 4 раза количества синтезированных ПАВ.

Показатели синтеза ПАВ на н-гексадекане, установленные для *R. erythropolis* ЭК-1, сравнимы с синтезирующей способностью родококков, описанных в литературе [5–7]. Однако по сравнению с другими

представителями рода *Rhodococcus* селекционированный нами штамм имеет следующие преимущества: 1) способен синтезировать ПАВ на среде с общим содержанием солей 3.15 г/л (для других родококков – до 10 г/л); 2) не требует наличия в среде микроэлементов и дрожжевого экстракта; 3) синтезирует ПАВ с более высоким выходом от субстрата.

Необходимым этапом разработки технологии микробного синтеза является масштабирование процесса на ферментационном оборудовании. Культивирование продуцента в ферментере позволяет также исследовать влияние на биосинтез таких важных параметров, как аэрация, скорость перемешивания, режим внесения субстрата, pH и др., что позволяет повысить эффективность технологии.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных исследованиям микробных поверхностно-активных веществ [5–10], сведения о масштабировании технологий их биосинтеза либо об особенностях образования этих продуктов микробного синтеза при культивировании микроорганизмов-продуцентов в лабораторных биореакторах немногочисленны [5, 11–15]. Первые такие сообщения появились в конце 70-х–середине 80-х годов XX века и касались масштабирования процессов биосинтеза поверхностно-активных трегалозолипидов [16] и рамнолипидов [17, 18]. Позже сведения о культивировании в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus*–продуцентов ПАВ были обобщены в обзоре [5].

Отметим, что на сегодняшний день масштабированы многие технологии получения микробных ПАВ на различных промышленных отходах или

продуктах переработки растительного сырья [11, 15, 19, 20]. Так, при культивировании *Bacillus subtilis* LB5a в 40 л ферментере на отходах производства муки из маниоки количество синтезированных липопептидов через 12 ч достигало 10 г/л [15]. Выращивание *Pseudozyma* (ранее *Candida*) *antarctica* ATCC 20509 — продуцента маннозоэритрит-липидов в биореакторе (2 л) на среде, содержащей 80 г/л соевого масла, сопровождалось синтезом 46 г/л гликолипидов [11]. Выход софоролипидов от субстрата при периодическом культивировании *Candida bombicola* ATCC 22214 на среде, содержащей кукурузную муку (100 г/л) и глюкозу (100 г/л) в ферментере (3 л), составлял 60% [19]. Выращивание *Pseudomonas* sp. DSM 2874 в 2 л реакторе с дробным внесением субстрата (рапсовое масло) дало возможность повысить синтез рамнолипидов до 45 г/л [20].

На сегодняшний день в литературе имеются немногочисленные сведения об особенностях культивирования в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus*—продуцентов поверхностно-активных веществ. Возможно, одной из причин этого является тот факт, что ПАВ-синтезирующая способность родококков несколько ниже, чем продуцентов других гликолипидов (рамно-, софоро- маннозоэритрит-липиды). Кроме того, недостатком представителей рода *Rhodococcus* как продуцентов ПАВ является их медленный рост и, как следствие, длительный процесс биосинтеза целевого продукта. Так, при культивировании *R. erythropolis* ATCC 4277 в течение 51 ч в ферментере объемом 1.5 л на среде с глицерином (15 г/л) количество синтезированных ПАВ составляло всего лишь 1.7 г/л [13]. При использовании в качестве источника углерода *n*-алканов (20 г/л) количество ПАВ, синтезируемых *R. erythropolis* DSM 43215 в биореакторе (50 л) за 36–38 ч роста, достигало 2 г/л [16], а при культивировании этого же штамма в 20 л ферментере в течение 160 ч на среде, содержащей 100 г/л *n*-алканов — 32 г/л [5]. Штамм *R. erythropolis* SD-74 через 240 ч культивирования в биореакторе объемом 5 л синтезировал из 80 г/л *n*-гексадекана до 40 г/л поверхностно-активных липидов [5]. В большинстве случаев высокая концентрация ПАВ была достигнута в результате синтеза этих соединений покоящимися или иммобилизованными клетками бактерий рода *Rhodococcus*.

Отметим, что недавно появились сообщения о быстрорастущем штамме *Rhodococcus* sp. Moj-3449, который характеризовался высокой скоростью роста (до 0.2 ч⁻¹) на средах, содержащих до 180 г/л алканов или сырой нефти [21]. Однако в данной работе нет информации о способности штамма Moj-3449 к синтезу ПАВ.

Цель работы — установление оптимальных условий синтеза поверхностно-активных веществ при периодическом культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в лабораторном ферментере АК-210.

МЕТОДИКА

Объект исследований. Объект исследования — штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером ИМВ Ас-5017.

Состав сред и условия культивирования *R. erythropolis* ЭК-1. Бактерии выращивали на модифицированной нами жидкой минеральной среде Мюнца [22] (г/л): NaNO₃ — 1.3, NaCl — 1.0, Na₂HPO₄ · 12H₂O — 0.6, KH₂PO₄ — 0.14, MgSO₄ · 7H₂O — 0.1, FeSO₄ · 7H₂O — 0.01, pH 6.8–7.0. В качестве источника углерода и энергии использовали *n*-гексадекан в концентрации 1.0–2.4% (по объему).

В качестве посевного материала использовали культуру в ранней и средней экспоненциальной фазе роста (22–24 и 46–48 ч соответственно), выращенную на жидкой среде указанного состава, содержащей 1.0% (по объему) гексадекана. Для получения инокулята культивирование штамма ЭК-1 осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30°C. Количество посевного материала составляло 10% от объема засеваемой среды, концентрация клеток в посевном материале — 10⁴–10⁵/мл.

Культивирование бактерий осуществляли в ферментере АК-210 (Пушино, Россия) объемом 10 л (рабочий объем 7 л) в течение 40–100 ч при 28°C. В начале процесса скорость перемешивания составляла 250 об/мин, расход воздуха 0.2 л/л среды в мин. В процессе культивирования скорость перемешивания увеличивали до 380–400 об/мин, а расход воздуха — до 1.2 л/л среды в мин для поддержания концентрации растворенного кислорода (рO₂) на уровне 20–80% (от насыщения кислородом воздухом).

Для предупреждения коагуляции бактериальных клеток и налипания биомассы на стенки ферментера в одном из вариантов в среду культивирования дополнительно вносили препарат химопсин (смесь протеолитических ферментов трипсина и химотрипсина) в концентрации 0.025 и 0.05 мг/л.

В течение процесса культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 значение pH поддерживали на уровне 7.0, 7.5, 8.0 и 8.5 подкислением 1 н. раствором HCl или подщелачиванием 1 н. раствором NaOH.

При исследовании влияния способа подачи субстрата на рост *R. erythropolis* ЭК-1 и биосинтез ПАВ начальную концентрацию *n*-гексадекана в среде снижали до 0.1–0.4% (по объему). В процессе культивирования бактерий осуществляли дробное внесение *n*-гексадекана порциями по 0.2–0.5% каждые 3–8 ч до конечной концентрации субстрата 2.0–2.4%.

Массообменные характеристики ферментера при различных режимах аэрации и перемешивания определяли по сульфитному числу (K_S), которое анализировали, как описано в работе [23].

Определение показателей роста и синтеза ПАВ.

Сухую биомассу определяли весовым методом. Перед осаждением клеток (центрифугирование при 5000 g 20 мин, на центрифуге ОПН-8 (Россия) осуществляли двукратную отмывку культуральной жидкости гексаном для удаления остаточного гексадекана. Необходимость этой операции обусловлена соосаждением части гексадекана с клетками, что zvyšало значение биомассы.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям.

1) Поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью полуавтоматического тензиометра ("LAUDA TD1C", Германия). Перед определением показателя σ_s супернатант культуральной жидкости предварительно отмывали гексаном от остатков гексадекана, который обладает поверхностно-активными свойствами и существенно снижает реальное значение поверхностного натяжения.

2) Для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель условной концентрации ПАВ (ПАВ*), который определяли как степень разведения свободной от клеток культуральной жидкости (супернатант) до точки ККМ (критическая концентрация мицеллообразования). Строили график зависимости поверхностного натяжения σ_s от значения логарифма разведения супернатанта. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению ПАВ*. Условная концентрация ПАВ выражается в безразмерных единицах [3, 4].

3) Индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости. К 5 мл культуральной жидкости добавляли 5 мл подсолнечного масла (эмульгируемый субстрат) и встряхивали в течение 2 мин. Измерение индекса эмульгирования определяли через 24 ч, как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке, и выражали в процентах.

4) Количество внеклеточных ПАВ определяли весовым методом после экстракции их смесью хлороформа и метанола (2 : 1) из супернатанта культуральной жидкости. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 100 мл помещали 25 мл супернатанта, добавляли 5 мл 1 н. раствора HCl, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли 15 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (**органический экстракт 1**), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 5 мл 1 н. раствора HCl и 15 мл смеси

хлороформа и метанола (2 : 1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая **органический экстракт 2**. На третьем этапе к водной фазе добавляли 25 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая **органический экстракт 3**. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на роторном испарителе ИР-1М2 (ОАО "Химлаборприбор", Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы.

Максимальную удельную скорость роста ($\mu_{\text{макс}}$) и синтеза ПАВ ($P_{\text{макс}}$) определяли по общепринятым формулам [24]. Синтезирующую способность штамма ЭК-1 оценивали как отношение количества синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации биомассы и выражали в г ПАВ/г сухой биомассы. Выход ПАВ от субстрата определяли как отношение количества синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации заданного субстрата (в г/л) и выражали в процентах.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло 3–5. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли по алгоритму, описанному в работе [25]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [4] нами было показано, что при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в колбах на качалке в течение 168 ч на среде с 2% (по объему) н-гексадекана количество синтезированных ПАВ составляло около 4 г/л (условная концентрация ПАВ* 4.5). Установлено, что K_S системы, обеспечивающей максимальный синтез ПАВ при выращивании штамма ЭК-1 в колбах, составляло 0.14 г O_2 /л ч (300 об/мин, объем колбы 750 мл, рабочий объем 100 мл). Эксперименты показали, что K_S в ферментере достигало этого значения при начальной скорости перемешивания 250 об/мин и расходе воздуха 0.2 л/л среды в мин.

Влияние способа подачи субстрата на синтез ПАВ.

На первом этапе масштабирования в ферментере культивирование *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляли в условиях, обеспечивающих максимальный синтез ПАВ в колбах на качалке (состав среды, подготовка инокулята, показатель K_S) [4]. Эксперименты показали, что высокая начальная концентрация гексадекана (2%) ингибировала рост штамма ЭК-1 и образование ПАВ. При таком режиме внесения субстрата концентрация биомассы и ПАВ не превышала 0.6–0.7 г/л даже в течение 110 ч культивирования штамма ЭК-1 в ферментере.

Известно, что эффективным способом интенсификации синтеза микробных метаболитов, в том числе и ПАВ, является дробная подача в среду отно-

сительно невысоких концентраций субстрата [14, 20, 26].

Так, например, известно, что при культивировании *Pseudomonas aeruginosa* S2 в 5 л ферментере на глюкозосодержащей среде (6%) при постоянном pH (6.8 ± 0.3) количество синтезированных рамнолипидов составляло 6 г/л [14]. Снижение начальной концентрации глюкозы до 1% с последующим дробным внесением в течение процесса культивирования до конечной концентрации 6% дало возможность увеличить синтез рамнолипидов до 9.4 г/л [14].

Наши исследования показали, что внесение в среду культивирования штамма ЭК-1 н-гексадекана порциями по 0.1% каждые 7–8 ч сопровождалось повышением в 5 раз показателя условной концентрации ПАВ (до 3.0–3.2) по сравнению с однократным внесением 2% гексадекана. Однако при этом продолжительность лаг-фазы оставалась высокой и составляла 20–25 ч.

В связи с этим на следующем этапе определяли оптимальный для синтеза ПАВ режим внесения субстрата. Эксперименты показали, что повышение начальной концентрации н-гексадекана в среде культивирования штамма ЭК-1 с 0.1 до 0.2–0.3% с последующим дробным внесением порциями по 0.2% через 7–8 ч позволило увеличить показатель условной концентрации ПАВ до 4.2 (табл. 1). При таком способе подачи субстрата наблюдали снижение продолжительности лаг-фазы до 8–10 ч. Далее определяли оптимальный промежуток времени между внесением порций н-гексадекана. Установлено, что уменьшение интервала между подачей субстрата до 5–6 ч позволило активизировать синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ* 5.0) и сократить продолжительность процесса биосинтеза до 65 ч (табл. 2).

Дальнейшие эксперименты показали, что при дробном внесении н-гексадекана порциями по 0.3–0.4% в процессе культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 показатель ПАВ* достигал значения 6.0 уже к 60 ч (табл. 3).

Влияние химопсина на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1. Характерной особенностью роста *R. erythropolis* ЭК-1 на среде с н-гексадеканом является агрегация клеток и их налипание на рабочих поверхностях реактора. Такой характер роста усложняет транспорт кислорода и субстрата в клетки бактерий. С целью получения гомогенной суспензионной культуры в начале процесса культивирования в среду вносили препарат химопсин. Известно, что подобные препараты широко используются для дезагрегации тканей и конгломератов клеток и отделения клеточного монослоя от субстрата [27, 28].

Эксперименты показали, что при наличии ферментного препарата в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 не наблюдалось агрегации клеток, культуральная жидкость оставалась гомогенной в течение всего процесса биосинтеза. Однако в таких

Таблица 1. Зависимость синтеза ПАВ от начальной концентрации н-гексадекана в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1

Начальная концентрация гексадекана, %	Индекс эмульгирования культуральной жидкости, %	ПАВ*
0.1	58 ± 2.9	3.2 ± 0.16
0.2	55 ± 2.7	4.2 ± 0.21
0.3	50 ± 2.5	4.2 ± 0.21
0.4	27 ± 1.4	2.4 ± 0.12
2.4	20 ± 1.0	0.6 ± 0.03

Примечание. Условия культивирования: pO₂ 20–30%; pH не регулировали; температура 28°C; субстрат добавляли порциями по 0.2% каждые 7–8 ч до конечной концентрации 2.4%; во всех вариантах длительность процесса составляла 80–85 ч.

Таблица 2. Зависимость синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 от интервала внесения н-гексадекана

Интервал внесения н-гексадекана, ч	Продолжительность культивирования, ч	ПАВ*
4	90	4.3 ± 0.22
5	65	5.0 ± 0.25
6	65	5.0 ± 0.25
7	80	4.2 ± 0.21

Примечание. Аналогично табл. 1, только начальная концентрация гексадекана 0.2%.

Таблица 3. Влияние концентрации дробно внесенного н-гексадекана на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1

Концентрация дробно внесенного гексадекана, %	Продолжительность культивирования, ч	ПАВ*
0.2	65	5.0 ± 0.25
0.3	60	6.0 ± 0.30
0.4	60	6.0 ± 0.30
0.5	90	4.2 ± 0.21

Примечание. Аналогично табл. 1, только субстрат вносили через 5–6 ч.

условиях продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 50 ч и синтез ПАВ снижался. Так, при концентрации химопсина в среде 0.025 мг/л показатель ПАВ* в течение всего процесса культивирования был почти в два раза ниже, чем на среде без ферментного препарата. Повышение концентрации химопсина до 0.05 мг/л не сопровождалось дальнейшим снижением условной концентрации ПАВ*. В присутствии ферментного препарата индекс эмуль-

Таблица 4. Влияние фазы роста инокулята и концентрации растворенного кислорода на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1

Концентрация растворенного кислорода, %	Время выращивания инокулята, ч	Показатель процесса	
		ПАВ*	длительность лаг-фазы, ч
20–30	22–24	1.0 ± 0.05	30 ± 1.5
	46–48	6.0 ± 0.29	8 ± 0.4
60–70	22–24	0.3 ± 0.01	40 ± 2.0
	46–48	7.0 ± 0.35	0.5 ± 0.02

Примечание. Аналогично табл. 3, только субстрат вносили порциями по 0.3–0.4%. Продолжительность культивирования 60 ч.

гирования культуральной жидкости оставался постоянным и не превышал 30–40%.

Влияние качества инокулята и концентрации растворенного кислорода на синтез ПАВ. Независимо от концентрации растворенного кислорода в среде при использовании инокулята из ранней экспоненциальной фазы роста показатели синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 были невысокими (максимальное значение условной концентрации ПАВ достигало всего лишь 0.3–1.0 к 60 ч культивирования), а длительность лаг-фазы составляла 30–40 ч (табл. 4). Отметим, что в случае применения посевного материала из ранней экспоненциальной фазы повышение pO_2 до 60–70% сопровождалось снижением уровня биомассы и ПАВ по сравнению с культивированием штамма ЭК-1 при более низкой концентрации растворенного кислорода (табл. 4).

Использование инокулята из середины экспоненциальной фазы (46–48 ч роста) сопровождалось существенным повышением показателей синтеза ПАВ (табл. 4). Максимальное значение условной концентрации ПАВ (7.0) наблюдалось при pO_2 60–70%. В таких условиях наблюдали интенсивный рост штамма, длительность лаг-фазы составляла всего 0.5 ч, а синтез ПАВ начинался с первых часов куль-

тивирования продуцента. При pO_2 20–30% показатель ПАВ* к 60 ч роста достигал значения 6.0, однако продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 8 ч. Отметим, что культивирование бактерий при высоких концентрациях растворенного кислорода позволило существенно уменьшить агрегацию клеток и их налипание на стенки ферментера.

Учитывая, что концентрация клеток в посевном материале из разных фаз роста является различной, на следующем этапе исследовали зависимость синтеза ПАВ (при pO_2 20–30 и 60–70%) от физиологического состояния инокулята, стандартизованного по начальному количеству клеток (10^4 /мл). Результаты экспериментов полностью подтвердили установленные ранее закономерности (см. табл. 4), свидетельствующие о зависимости синтеза ПАВ как от концентрации растворенного кислорода, так и от физиологического состояния посевного материала (но не количества клеток в нем).

Влияние pH на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1. В предыдущих экспериментах культивирование *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляли без регуляции pH. Начальное значение pH среды составляло 6.8–7.0, затем постепенно повышалось до 8.2–8.4 к середине экспоненциальной фазы роста и оставалось на таком уровне до конца процесса культивирования штамма ЭК-1. Поскольку для большинства продуцентов оптимальным для синтеза ПАВ является pH, близкое к нейтральному [5, 6], на следующем этапе исследовали образование метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами в зависимости от pH среды, которое поддерживали постоянным в процессе культивирования *R. erythropolis* ЭК-1.

Как видно из представленных в табл. 5 данных, выращивание штамма ЭК-1 при pH 8.0 сопровождалось интенсификацией синтеза ПАВ. В таких условиях культивирования концентрация внеклеточных ПАВ, удельная скорость их синтеза и ПАВ-синтезирующая способность были максимальными (7.2 г/л, 0.43 ч^{-1} и 4.2 г ПАВ/г биомассы соответственно), а выход ПАВ от субстрата достигал 50% (табл. 5).

Таблица 5. Зависимость показателей роста и синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 от pH

pH	$\mu_{\text{макс}}, \text{ч}^{-1}$	ПАВ, г/л	$P_{\text{макс}}, \text{ч}^{-1}$	$E_{24}, \%$	ПАВ-синтезирующая способность, г/г биомассы	Выход ПАВ, % (от субстрата)
7.0	0.13 ± 0.01	2.1 ± 0.11	0.13 ± 0.01	100 ± 5.0	1.1 ± 0.05	14.8 ± 0.7
7.5	0.12 ± 0.01	4.2 ± 0.21	0.20 ± 0.01	68 ± 3.0	2.0 ± 0.10	29.3 ± 1.4
8.0	0.10 ± 0.01	7.2 ± 0.36	0.43 ± 0.02	50 ± 2.0	4.2 ± 0.17	49.7 ± 2.4
8.5	0.11 ± 0.01	6.4 ± 0.32	0.21 ± 0.01	52 ± 2.0	3.2 ± 0.16	47.4 ± 2.3

Примечание. Режим внесения субстрата аналогично табл. 4. Время достижения максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\text{макс}}$) и синтеза ПАВ ($P_{\text{макс}}$) во всех вариантах составляло 6 и 30 ч соответственно; pO_2 60–70%; температура 28°C; длительность культивирования 48 ч; определение индекса эмульгирования проводили для нативной культуральной жидкости; субстрат для эмульгирования – подсолнечное масло.

Таблица 6. Сравнительные показатели синтеза ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 и других представителей рода *Rhodococcus* в биореакторах

Штамм, литературная ссылка	Источник углерода, концентрация, г/л	Биомасса, г/л	ПАВ			Длительность процесса, ч
			г/л	выход, % (от субстрата)	г/г биомассы	
DSM 43215 [20]	C ₁₂ –C ₁₈ –н-алканы; 20.0	19.0	2.0	10	0.11	38
DSM 43215 [5]	C ₁₀ –н-алканы; 100	8.0	32.0	32	4.0	160
SD-74 [5]	н-гексадекан; 80.0	12.0	40.0	50	3.3	240
ЭК-1	н-гексадекан; 14.4	1.7	7.2	50	4.2	48

Снижение рН до 7.0–7.5 приводило к ингибированию синтеза ПАВ, однако максимальный индекс эмульгирования культуральной жидкости был зафиксирован при поддержании рН на уровне 7.0 (табл. 5). Эти данные свидетельствовали о преимущественном синтезе при нейтральном значении рН метаболитов с эмульгирующими, но не поверхностно-активными свойствами, а также о возможности изменения направленности процессов биосинтеза у штамма ЭК-1 в сторону образования ПАВ либо эмульгатора изменением рН.

В табл. 6 приведены сравнительные показатели синтеза ПАВ штаммом ЭК-1 и другими представителями рода *Rhodococcus* при культивировании в биореакторах на средах с н-алканами. Как видно из представленных данных, *R. erythropolis* ЭК-1 не уступает, а по некоторым показателям превосходит известные штаммы. Так, при культивировании штамма ЭК-1 в биореакторе (в установленных оптимальных условиях) синтезируются в основном внеклеточные ПАВ, в то время как для других родококков в литературе (см. табл. 6) приводится концентрация суммарных поверхностно-активных веществ (как ассоциированных с клетками, так и внеклеточных).

В работе [29] содержатся сведения о синтезе ПАВ в процессе непрерывного хеMOSTАТНОГО культивирования *R. ruber* IEGM на среде с н-гексадеканом (20 г/л). Однако в этой статье не приводятся данные количественного определения ПАВ (в г/л). Авторы оценивали уровень синтеза поверхностно-активных веществ по значению поверхностного натяжения и показателю разведения культуральной жидкости, при котором сохранялись поверхностно-активные свойства (без пересчета на условную концентрацию ПАВ), в связи с чем сравнение результатов работы [29] с данными табл. 6 не представляется возможным.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что максимальный синтез ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 наблюдался при таком способе подачи субстрата: начальная концентрация н-гексадекана в среде 0.2–0.3% с последующим дробным внесением через 5–6 ч порциями по 0.3–0.4% до ко-

нечной концентрации 2.4% (по объему). Использование такого способа подачи н-гексадекана дало возможность сократить в 2 раза продолжительность культивирования (со 110 до 60 ч) и повысить более, чем в 6 раз (с 0.6 до 6.0) условную концентрацию ПАВ* по сравнению с одноразовым внесением субстрата. Установлено, что поддержание рН на уровне 8.0 позволяет интенсифицировать синтез метаболитов с поверхностно-активными свойствами. При дробном внесении н-гексадекана, поддержании в процессе культивирования рН на уровне 8.0 и концентрации растворенного кислорода на уровне 60–70%, а также использовании 10% инокулята, выращенного до середины экспоненциальной фазы на среде с 1.0% н-гексадекана, количество внеклеточных ПАВ через 48 ч составляло 7.2 г/л, а выход ПАВ от заданного субстрата достигал 50%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 58–63.
2. Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Шеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 175–179.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
5. Lang S., Philp J.C. // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 74. № 1–3. P. 59–70.
6. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. № 2. P. 154–162.
7. Kuyukina M.S., Ivchina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 46. № 2. P. 149–156.
8. Mukherjee S., Das P., Sen R. // Trends in Biotechnology. 2006. V. 24. № 11. P. 509–515.
9. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. // Biotechnol. Adv. 2007. V. 25. № 1. P. 99–121.
10. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. № 4. P. 609–618.

11. Adamczak M., Bednarski W. // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. № 1. P. 313–316.
12. Rau U., Nguyen L.A., Roepert H., Koch H., Lang S. // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2005. V. 107. № 2. P. 373–380.
13. Ciapina E.M., Melo W.C., Santa Anna L.M., Santos A.S., Freire D.M., Pereira J.N. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129–132. № 1–3. P. 880–886.
14. Chen S.Y., Wei Y.H., Chang J.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. № 1. P. 67–74.
15. Barros F.F.C., Ponezi A.N., Pastore G.M. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 35. № 9. P. 1071–1078.
16. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. // *J. Gen. Microbiol.* 1979. V. 115. № 2. P. 491–503.
17. Guerra-Santos L., Käppeli O., Fiechter A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 48. № 2. P. 302–305.
18. Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Käppeli O., Fiechter A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. V. 51. № 5. P. 985–989.
19. Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N. // *Eng. Life Sci.* 2005. V. 5, № 4. P. 357–362.
20. Trummler K., Effenberger F., Syldatk C. // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003. V. 105. № 2. P. 563–571.
21. Binazadeh M., Karimi I.A., Li Z. // *Enzyme Microbial Technol.* 2009. V. 45. № 1. P. 195–202.
22. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д.Г. Звягинцев. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
23. Процессы и аппараты пищевых производств. Лабораторный практикум / Ред. В.Н. Стабников. Киев: Вища школа, 1986. 175 с.
24. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
26. Пирог Т.П., Корж Ю.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 2. С. 180–188.
27. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
28. Культура животных клеток. Методы / Ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
29. Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. № 2–3. P. 318–324.

Scaling of the Process of Biosynthesis of Surfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on Hexadecane

T. P. Pirog and S. V. Ignatenko^a

Institute of Microbiology and Virusology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 03680 Ukraine

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

^a *National University of Food Technologies, Kiev, 01601 Ukraine*

Abstract—Peculiarities of synthesis of surface-active substances (SAS) are studied at periodical cultivation of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 in the AK-210 fermenter on medium containing n-hexadecane. Maximum indicators of SAS synthesis (concentration of extra cellular SAS is 7.2 g/l; factor of emulsification of the cultural liquid 50%; SAS yield from the substrate 50%) have been observed at 60–70% concentration of dissolved oxygen from the saturation level with aerial oxygen (pH 8.0) fractional supply of the substrate by portions each being 0.3–0.4% every 5–6 h to a final volume concentration of 2.4% and with the use of 10% inoculate grown until mid-exponential phase on the medium with 1.0 vol % of n-hexadecane. Implementation of the process of SAS biosynthesis with the fermentation equipment provided the possibility to increase almost two-fold the amount of the synthesized SAS and reduce 3.5-fold the time of cultivation of the producer strain compared with the growth in flasks at shake-flask propagator.