

## ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ШТАМОМ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 У СЕРЕДОВИЩІ З ГЛІЦЕРОЛОМ

Т. П. Пирог<sup>1,2</sup>  
Т. А. Шевчук<sup>1</sup>  
М. О. Шулякова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного  
НАН України, Київ

<sup>2</sup>Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Отримано 10.05.2012

Встановлено можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на гліцеролі за присутності фумарату (C<sub>4</sub>-дикарбонова кислота, попередник глюконеогенезу) і цитрату (регулятор синтезу ліпідів).

Однчасне внесення у середовище з гліцеролом (1%, об'ємна частка) фумарату і цитрату (0,01–0,02%) супроводжувалося підвищенням у 2–2,5 раза концентрації позаклітинних поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот. Збільшення синтезу їх за таких умов зумовлено одночасним функціонуванням двох анаплеротичних шляхів (гліюксилатного циклу і фосфоенолпіруват-карбоксилазної реакції), а також підвищенням у 3–5 разів активності ферментів біосинтезу поверхнево-активних глію- (фосфоенолпіруват-синтетаза і фосфоенолпіруват-карбоксикіназа) та аміноліпідів (НАДФ-залежна глутаматдегідрогеназа).

Максимальні показники синтезу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на гліцеролі спостерігалися за наявності в середовищі дріжджового автолізу та мікроелементів і в разі використання поживного матеріалу, вирощеного на середовищі без факторів росту. За присутності в гліцерольмісному середовищі для одержання інокуляту і культивування бактерій сульфату заліза відбувалося зниження синтезу поверхнево-активних речовин, зумовлене інгібуючим впливом Fe<sup>2+</sup> на активність ферментів біосинтезу їх у штаму IMB B-7241.

Одержані дані можуть бути основою для розроблення нової технології одержання поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, органічні кислоти, гліцерол, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241.

Упродовж останніх 15–20 років мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлено їхніми унікальними фізико-хімічними властивостями [1]. ПАР мікробного походження широко використовують у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоефективних 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].

Раніше [2] ми повідомляли про здатність ізолюваного нами штаму *Acinetobacter cal-*

*coaceticus* IMB B-7241 синтезувати ПАР під час культивування на гідрофільних і гідрофобних субстратах (гексадекан, рідкі парафіни, етанол, глюкоза) [2].

Слід зазначити, що представники роду *Acinetobacter* синтезують високомолекулярні сурфактанти, яким притаманні емульгувальні, проте не поверхнево-активні властивості [3, 4]. Найбільш вивченими на сьогодні є емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, нова назва — *A. venetianus* RAG-1 [3], *A. calcoaceticus* BD4), алазан (продуцент *A. radioresistens* K53 и KA53) та дисперсан (продуцент *A. calcoaceticus* A2). За хімічною природою ці продукти мікробного синтезу є комплексом позаклітинних полісахаридів і протеїнів. Лише нещодавно у літературі з'явилася одне з перших повідомлень [5] про здатність бактерій роду *Acinetobacter* синтезувати

низькомолекулярні ПАР, але тільки на гідрофобних субстратах.

Селекціонований нами штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує незвичні за хімічним складом ПАР, які є комплексом нейтральних, аміно- і гліколіпідів [2], причому гліколіпіди представлені трегалозоміколатами — метаболітами, характерними для бактерій роду *Rhodococcus*, проте не *Acinetobacter* [4]. Здатність *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 до утворення трегалозоміколатів було підтверджено також і ензимологічними дослідженнями [6].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та значні переваги їх порівняно із синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні дотепер не реалізовано, а чинниками, 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 речовин [7]. Тому багатообіцяльним підходом до інтенсифікації технологій мікробних ПАР є використання дешевих ростових субстратів (продуктів перероблення основної сировини або відходів різних галузей промисловості) [8].

Зі зростанням обсягів виробництва біодизеля у світі постала проблема утилізації гліцеролу — побічного продукту трансестерифікації рослинних олій чи тваринних жирів, причому на кожні 100 л біодизеля утворюється майже стільки ж літрів технічного гліцеролу [9]. Тільки за період з 2004 до 2006 р. ціна на гліцерол знизилась більш ніж у 10 разів. Це зумовило істотні зміни в багатьох галузях промисловості, наприклад фірма Procter and Gamble перестала виробляти власний гліцерол, як і багато інших косметологічних компаній. Тому переробка технічного гліцеролу на більш цінні продукти є актуальною проблемою [9].

Уже на сьогодні спектр речовин, одержуваних мікробною конверсією гліцеролу достатньо широкий. Це органічні кислоти (пропіонат, сукцинат, піруват, цитрат) [9–12], спирти (етанол, 1,3-пропандіол) [9, 11, 13], кетони (дигідроксіацетон) [9, 11], амінокислоти (фенілаланін) [14], полієфіри (полігідроксіалканоати) [15], пігменти (ас-таксантин, продигіозин) [9, 11], екзополісахариди [16] і поверхнево-активні речовини [9, 11, 17, 18].

Ще одним підходом до підвищення ефективності технологій мікробного синтезу є внесення у середовище екзогенних поперед-

ників біосинтезу [19]. Раніше такий підхід був використаний нами для підвищення синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, які є комплексом нейтральних ліпідів і гліколіпідів [19]. Встановлено, що за наявності у середовищі з етанолом або гексадеканом цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і фумарату (попередник глюконеогенезу) показники синтезу ПАР збільшувалися на 40–100%.

У зв'язку із цим метою даної роботи було дослідження синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцеролі за присутності органічних кислот і встановлення механізмів, що забезпечують інтенсифікацію біосинтезу поверхнево-активних речовин.

## Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 [2], ізольований із забрудненого нафтою зразка ґрунту і депонований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером ІМВ В-7241.

Вирощування бактерій здійснювали на модифікованому нами [2] рідкому мінеральному середовищі Мюнца (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,3;  $\text{NaCl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1; рН 6,8–7,0. У середовище додавали дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1% (об'ємна частка). Розчин мікроелементів мав такий склад (г/100мл):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 1,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,03;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  — 0,004;  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — 0,006;  $\text{KI}$  — 0,0001; трилон Б — 0,5. Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерол у концентрації 1% (об'ємна частка).

Як попередники синтезу ПАР застосовували цитрат натрію та фумарат натрію в концентраціях 0,01–0,5% (масова частка), які додавали у середовище у вигляді 10%-х розчинів. Органічні кислоти вносили у середовище з гліцеролом на початку стаціонарної фази росту продуцента.

Посівним матеріалом слугувала добова культура, вирощена на м'ясо-пептонному агарі (МПА), а також культура з експоненційної фази росту (48 год), вирощена на середовищі наведеного вище складу з 0,5% гліцеролу, в яке вносили (окремо і разом) дріжджовий автолізат і мікроелементи. Кількість посівного матеріалу становила 5% від об'єму середовища ( $10^4$ – $10^5$  клітин/мл). Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 48–120 год.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу відповідно до калібрувального графіка.

Поверхневий натяг ( $\sigma_s$ ) визначали за допомогою напіваавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина). Для оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник «умовної концентрації ПАР» (ПАР\*, безрозмірні одиниці). Цей показник визначали як ступінь розведення культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на графіку залежності  $\sigma_s$  від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР.

Для визначення емульгуювальної здатності (індекс емульгування) до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл субстрату для емульгування (соняшникову олію) та струшували упродовж 2 хв. Індекс емульгування ( $E_{24}$ ) вимірювали через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці й виражали у відсотках.

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г/л) визначали так. Культуральну рідину центрифугували (5000 г, 20 хв) для відділення біомаси. 25 мл супернатанта переносили у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додавали 5 мл 1 М HCl, воронку закривали прищліфованим корком і струшували упродовж 3 хв, далі додавали ще 4 мл 1 М HCl й 16 мл суміші хлороформу та метанолу (2:1) і струшували протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу ще раз екстрагували. Під час повторної екстракції у водну фазу додавали 9 мл 1М HCl, 16 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і здійснювали екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирали нижню фракцію (органічний екстракт 2). На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і проводили екстракцію як описано вище, при цьому одержували органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 об'єднували і упарювали на роторному випарнику ІР-ІМ2 (Росія) при температурі 50 °С за абсолютного тиску 0,4 атм до постійної маси.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* К-4 на рідкому се-

редовищі з гліцеролом, центрифугували (5 000 г, 20 хв, 4 °С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М  $K^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0) і центрифугували (4 000 г, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М  $K^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °С на апараті УЗДН-1 (Росія). Одержаний дезінтеграт центрифугували (12 000 г, 30 хв, 4 °С), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ензимів аналізували як описано нами раніше [20]: ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1.) — за швидкістю утворення фенілгідразону гліоксилату при 324 нм, ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) і глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) — за відновленням НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм за присутності ізоцитрату і 2-оксоглутарату відповідно, фосфенолпіруват(ФЕП)-синтетази (систематична назва ензиму — піруват, вода дикіназа; КФ 2.7.9.2) — за швидкістю утворення пірувату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31) і ФЕП-карбоккінази (КФ 4.1.1.49) — за швидкістю утворення малату з оксалоацетату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою.

Активність ензимів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг протеїну. Вміст протеїну у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [21].

Активність ензимів аналізували при 28–30 °С — температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у роботі [22]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості  $P < 0,05$ .

## Результати та обговорення

**Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.** У попередніх дослідженнях [2] нами було встановлено, що під час культивування штаму *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етаполі показники синтезу ПАР підвищувалися за внесення у середовище дріжджового автолізу і мікроелементів. Водночас за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 в середовищі з гліцеролом внесення до нього

дріжджового автолізу та мікроелементів супроводжувалося суттєвим зниженням показника умовної концентрації ПАР та індексу емульгування (до 1,1 і 40% відповідно, табл. 1). Найвищі показники синтезу ПАР (ПАР\* 3,2 і  $E_{24}$  60%) спостерігали за використанням посівного матеріалу, вирощеного на середовищі без факторів росту (табл. 1).

Подальші enzymатичні дослідження підтвердили дані ростових експериментів (табл. 2). Так, у разі застосування інокуляту, одержаного на середовищі з гліцеролом, дріжджовим автолізатом і мікроелементами, активність enzymів анаплеротичних шляхів (ФЕП-карбоксилаза), біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів (НАДФ<sup>+</sup>-залежна глутаматдегідрогеназа) і гліколіпідів (ФЕП-карбоксікіназа) були в кілька разів нижчими порівняно з використанням посівного матеріалу, вирощеного за відсутності у середовищі факторів росту. Зазначимо, що у процесі культивування на гліцеролі, на відміну від вирощування на етанолі [6], у дослідженому штаму не функціонує гліоксилатний цикл (не виявлено активності ізоцитратліази), а роль анаплеротичної виконує ФЕП-карбоксилазна реакція (табл. 2).

Таблиця 1. Вплив якості інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцеролі

Наявність дріжджового автолізу та мікроелементів у середовищі для		ПАР*	$E_{24}$ , %
одержання інокуляту	біосинтезу ПАР		
–	–	1,8±0,09	45±2,2
+	–	1,6±0,08	47±2,3
–	+	3,2±0,16	60±3,0
+	+	1,1±0,05	40±2,0

Реакція карбоксилювання фосфоенолпірувату (як і карбоксилювання пірувату) є анаплеротичною у процесі культивування мікроорганізмів на вуглеводних субстратах [23], тому функціонування її в клітинах *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, вирощених на гліцеролі, потребує додаткових пояснень. У попередніх дослідженнях [2] нами було встановлено, що найвищі показники синтезу ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7241 на етанолі спостерігалися за використанням сечовини як джерела азотного живлення. У наступній праці [24] ми обговорювали фізіологічну роль ФЕП-карбоксилази у процесі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі з етанолом і сечовиною

як спосіб знешкодження вуглекислого газу, утворюваного в уреазній реакції, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням у клітинах бактерій пулу C<sub>4</sub>-дикарбонових кислот, посиленням глюконеогенезу і збільшенням синтезу поверхнево-активних гліколіпідів.

Таблиця 2. Активність enzymів анаплеротичних шляхів і біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 залежно від способу підготовки інокуляту

Enzymи	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> протеїну) за використання інокуляту, вирощеного на середовищі	
	з дріжджовим автолізатом і мікроелементами	без дріжджового автолізу та мікроелементів
Ізоцитратліаза	0	0
ФЕП-карбоксилаза	191±9	1045±52
НАДФ <sup>+</sup> -залежна глутаматдегідрогеназа	223±11	597±30
ФЕП-синтетаза	1684±88	1780±89
ФЕП-карбоксікіназа	159±8	448±22

Примітка. Тут і в табл. 3 активність enzymів визначали в безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, які перебували у середині експоненційної фази росту (48 год).

Аналізуючи результати, наведені у табл. 1 і 2, ми припустили, що недоцільність внесення дріжджового автолізу та мікроелементів у середовище для одержання рідкого інокуляту зумовлена наявністю у посівній культурі так званих «ендогенних» запасів після вирощування її на багатому агаризованому середовищі (МПА), а додаткове внесення ростових факторів чи мікроелементів може призвести до підвищення концентрації якихось із них вище оптимального рівня.

Оскільки як у дріжджовому автолізаті, так і в складі мікроелементів міститься Fe<sup>2+</sup>, то цілком імовірно, що критичним фактором для біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 можуть бути катіони заліза. Для перевірки цього припущення на наступному етапі аналізували активність enzymів біосинтезу ПАР за наявності у реакційній суміші різних концентрацій Fe<sup>2+</sup>. Як свідчать дані, наведені в табл. 3, активність усіх досліджуваних enzymів за присутності 0,05–0,1 мМ катіонів заліза знижувалась на 20–40%. У зв'язку з цим у наступних дослідженнях посівний матеріал вирощували на середовищі з гліцеролом без дріжджового автолізу та мікроелементів.

Таблиця 3. Вплив катіонів заліза на активність ензимів біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Концентрація FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, мМ	Активність, % від контролю			
	НАДФ <sup>+</sup> -залежна глутамат-дегідрогеназа	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксилаза	ФЕП-карбоксикіназа
0,05	80±4	73±4	71±3	Н.в.
0,1	70±3	66±3	65±3	73±4

Примітка. Посівний матеріал вирощено на середовищі з гліцеролом, дріжджовим автолізатом і мікроелементами.

**Особливості синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за присутності органічних кислот.** Оскільки ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 є комплексом нейтральних, аміно- і гліколіпідів [2], ми припустили, що як і для штаму *R. erythropolis* ЕК-1 [19] можна підвищити синтез ПАР уведенням у середовище фумарату і цитрату. Фумарат, як й інші С<sub>4</sub>-дикарбонові кислоти, є попередником глюконеогенезу, що забезпечує синтез вуглеводів, а отже й гліколіпідів (трегалозоміколатів). Стимулювальний вплив цитрату натрію на утворення ПАР мікроорганізмами було встановлено у 80–90 роках ХХ ст. [25]. Такий ефект пояснюють активуючим впливом цитрату на ензим ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, й ПАР ліпідної природи.

Раніше [19] нами було встановлено, що збільшення показників синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом або гексадеканом спостерігали у разі одночасного внесення на початку стаціонарної фази росту продуцента цитрату і фумарату в концентрації 0,1 і 0,2% відповідно. Проте дослідження, проведені зі штамом ІМВ В-7241, показали, що підвищення умовної концентрації ПАР відбувалося за нижчих на порядок концентрацій органічних кислот (0,01–0,02%, табл. 4), причому воно було незначним порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без фумарату або цитрату. Незалежно від концентрації органічних кислот, доданих у середовище з гліцеролом, рівень біомаси практично не змінювався і становив 0,7–0,8 г/л, тобто стільки ж, як і за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі без фумарату або цитрату (табл. 4).

На наступному етапі на початку стаціонарної фази росту бактерій у середовище з гліцеролом одночасно вносили органічні кислоти у визначених оптимальних концентраціях (табл. 5). У цих дослідженнях як основний критерій синтезу ПАР використовували кількість їх (у г/л), яку визначали ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча. Це було зумовлено тим, що графік

Таблиця 4. Вплив різних концентрацій фумарату і цитрату на синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Концентрація фумарату, %	Концентрація цитрату, %	ПАР*	Біомаса, г/л
0	0,01	3,5±0,17	0,70±0,03
0	0,02	3,4±0,17	0,73±0,03
0	0,03	3,2±0,16	0,69±0,03
0	0,05	3,2±0,16	0,72±0,03
0	0,1	3,0±0,15	0,80±0,04
0	0,3	2,9±0,14	0,79±0,04
0	0,5	2,9±0,14	0,80±0,04
0,01	0	3,9±0,19	0,73±0,03
0,02	0	3,6±0,18	0,71±0,03
0,03	0	3,3±0,16	0,70±0,03
0,05	0	3,2±0,16	0,73±0,03
0,1	0	3,0±0,15	0,76±0,04
0,3	0	2,9±0,14	0,78±0,04
0,5	0	2,8±0,14	0,80±0,04
0	0	3,2±0,16	0,79±0,04

Примітка. Тут і в табл. 5 і 6 фумарат і цитрат вносили у середовище з гліцеролом, дріжджовим автолізатом і мікроелементами на початку стаціонарної фази росту (72 год). Посівний матеріал вирощено на середовищі з гліцеролом.

залежності поверхневого натягу від логарифму розведення вільної від клітин культуральної рідини штаму ІМВ В-7241 відрізнявся від характерних для інших штамів наявністю кількох точок підвищення поверхневого натягу з наступним зниженням за більшого розведення і тому коректно визначити дійсний показник умовної концентрації ПАР було неможливо. Дані, наведені в табл. 5, свідчать, що за одночасного внесення фумарату і цитрату (0,01–0,02%) концентрація позаклітинних ПАР підвищувалась удвічі порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без органічних кислот. Важливо, що за таких умов не спостерігали підвищення рівня біомаси.

Слід зазначити, що кількість ПАР, синтезованих мікроорганізмами на гліцеролі, суттєво нижча, ніж на традиційних гідрофобних субстратах. Так, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317<sup>т</sup> утворює 3,5 г/л ПАР з 10% (об'ємна частка) гліцеролу [17], дещо вищою є концентрація рамноліпідів: до 8 г/л на середовищі з 3% (об'ємна частка) гліцеролу

Таблиця 5. Синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 залежно від концентрації одночасно внесеного фумарату і цитрату

Концентрація фумарату, %	Концентрація цитрату, %	ПАР*	ПАР, г/л
0	0	3,2±0,16	1,1±0,05
0,01	0,01	3,6±0,18	2,4±0,12
0,02	0,02	3,5±0,18	2,5±0,12
0,01	0,02	3,4±0,17	2,3±0,11
0,02	0,01	3,4±0,17	2,3±0,11

для *Pseudomonas aeruginosa* УСР0992 [18]. Враховуючи, що концентрація гліцеролу в середовищі культивування досліджуваного нами штаму ІМВ В-7241 становить усього 1% (об'ємна частка), а кількість позаклітинних ПАР за наявності незначних концентрацій фумарату і цитрату досягає 2,5 г/л (табл. 5), така технологія за своєю ефективністю не поступається, а в деяких випадках і перевершує відомі у світі.

**Механізми інтенсифікації синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцеролі за присутності органічних кислот.** На даному етапі досліджень аналізували активність ензимів, що беруть участь у синтезі поверхнево-активних гліко- (ФЕП-синтетаза, ФЕП-карбоксикіназа) і аміноліпідів (НАДФ-залежна глутаматдегідрогеназа), а також ензимів анаплеротичних шляхів.

Дані, наведені у табл. 6, свідчать про посилення синтезу гліко- і аміноліпідів за умов росту штаму ІМВ В-7241 на середовищі з гліцеролом, фумаратом і цитратом. Так, у разі одночасного внесення органічних кислот активність глутаматдегідрогенази і ФЕП-карбоксикінази підвищувалась у 3, ФЕП-карбоксилази — у 3,5, а активність ФЕП-синтетази — більш ніж у 5 разів порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без фумарату і цитрату. На особливу увагу заслуговує той факт, що за внесення в середовище з гліцеролом органічних кислот

у клітинах *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 починає функціонувати гліюксилатний цикл (активність ізоцитратліази 50–80 нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> протеїну). Підвищення активності ензимів біосинтезу поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів та анаплеротичних шляхів спостерігали також у разі внесення в середовище з гліцеролом або тільки цитрату, або фумарату (табл. 6).

Встановлені нами закономірності впливу органічних кислот на синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 відрізняються від таких для *R. erythropolis* ЕК-1 [19]: по-перше, оптимальна концентрація фумарату і цитрату для штаму ІМВ В-7241 у 10 разів нижча; по-друге, ефект від одночасного внесення фумарату і цитрату у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з гліцеролом суттєвіший.

Результати наших досліджень відрізняються також і від відомих даних літератури. По-перше, у джерелах описано збільшення синтезу ПАР за наявності в середовищі тільки цитрату, який вносили на початку культивування [25, 26]. По-друге, оптимальна концентрація цитрату при цьому становила 0,5–1,0%. За такої концентрації цитрат можна розглядати не як регулятор синтезу ліпідів, а як додатковий ростовий субстрат. По-третє, нам не вдалося знайти у літературі відомостей про підвищення синтезу ПАР за наявності як цитрату, так і С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот.

Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що підвищення синтезу ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі з гліцеролом, фумаратом і цитратом зумовлено збільшенням у 3–5 разів активності ензимів біосинтезу поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів, а також одночасним функціонуванням двох анаплеротичних шляхів (гліюксилатного циклу і ФЕП-карбоксилазної реакції) порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без органічних кислот.

Таблиця 6. Вплив органічних кислот на активність ензимів біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Органічні кислоти	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> протеїну)				
	Ізоцитратліаза	НАДФ <sup>+</sup> -залежна глутаматдегідрогеназа	ФЕП-карбоксилаза	ФЕП-карбоксикіназа	ФЕП-синтетаза
Контроль (без органічних кислот)	0	122±6	285±14	163±8	610±30
Фумарат	52±2	422±21	571±29	857±43	1429±71
Цитрат	56±3	769±38	462±23	923±46	1231±62
Цитрат + фумарат	74±4	380±19	1013±51	506±25	3924±196

Примітка. Концентрація фумарату і цитрату — 0,02%; активність ензимів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, які перебували наприкінці стаціонарної фази росту (96 год).

ЛІТЕРАТУРА

1. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87, N 2. — P. 427–444.
2. Пирог Т. П., Антонюк И. С., Карпенко Е. В., Шевчук Т. А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохим. микробиол. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 304–310.
3. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An extracellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — V. 69, N 5. — P. 2608–2615.
4. Rosenberg E., Ron E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 52, N 2. — P. 154–162.
5. Zhao Z., Wong J. W. C. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene // Environ. Technol. — 2009. — V. 30, N 3. — P. 291–299.
6. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Дугинец О. С. Особенности окисления этанола у продуцента поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Микробиол. журн. — 2010. — Т. 72, N 6. — С. 3–10.
7. Mukherjee S., Das P., Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants // Trends in Biotechnol. — 2006. — V. 24, N 11. — P. 509–515.
8. Пирог Т. П., Игнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 29–38.
9. Da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. — 2009. — V. 27, N 1. — P. 30–39.
10. Rywinska A., Rytowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 37, N 5. — P. 431–435.
11. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. — 2007. — V. 18, N 3. — P. 213–219.
12. Zhu Y., Li J., Tan M. et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source // Biores. Technol. — 2010. — V. 101, N 22. — P. 8902–8906.
13. Yu K. O., Kim S. W., Han S. O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate // J. Bacteriol. — 2010. — V. 150, N 2. — P. 209–214.
14. Khamduang M., Packdibamrung K., Chutmanop J. et al. Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 36, N 10. — P. 1267–1274.
15. Ciesielski S., Pokoj T., Klimiuk E. Cultivation-dependent and independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw glycerol // J. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 20, N 5. — P. 853–861.
16. Freitas F., Alves V., Pais J. et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol // Biores. Technol. — 2009. — V. 100, N 2. — P. 859–865.
17. Morita T., Konishi M., Fukuoka T. et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317<sup>T</sup> // J. Biosci. Bioeng. — 2007. — V. 104, N 1. — P. 78–81.
18. Silva S. N. R. L., Farias C. B. B., Rufino R. D. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. — 2010. — V. 79, N 1. — P. 174–183.
19. Підгорський В. С., Гутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
20. Пирог Т. П., Кузьмінська Ю. В., Коваленко М. О. Метаболізм С<sub>2</sub>–С<sub>6</sub>-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 1. — С. 33–38.
21. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72, N 3. — P. 248–254.
22. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. школа, 1990. — 352.
23. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьмінська Ю. В. Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его С<sub>6</sub>-метаболизма // Микробиология. — 2002. — Т. 71, № 2. — С. 215–221.
24. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Долошенко Є. Ю. Роль фосфоенолпіруваткарбоксилази у синтезі поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 9–15.
25. De Roubin M. R., Mulligan C. N., Gibbs B. F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // Can. J. Microbiol. — 1989. — V. 35, N 9. — P. 854–859.
26. Леськ О. Ю., Елисеєв С. А., Полулях О. В., Карпенко Е. В. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // Микробиол. журн. — 1991. — Т. 53, № 2. — С. 36–40.

**ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ  
НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ ШТАММОМ  
*Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241  
НА СРЕДЕ С ГЛИЦЕРОЛОМ**

Т. П. Пирог<sup>1,2</sup>  
Т. А. Шевчук<sup>1</sup>  
М. А. Шулякова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев  
<sup>2</sup>Национальный университет  
пищевых технологий, Киев

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Установлена возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на глицероле в присутствии фумарата (C<sub>4</sub>-дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов).

Одновременное внесение в среду с глицеролом (1%, по объему) фумарата и цитрата (0,01–0,02%) сопровождалось повышением в 2–2,5 раза концентрации внеклеточных поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 по сравнению с культивированием бактерий на среде без органических кислот. Увеличение синтеза их при таких условиях обусловлено одновременным функционированием двух анаплеротических путей (гликосилатного цикла и фосфоенолпируват-карбоксилазной реакции), а также повышением в 3–5 раз активности энзимов биосинтеза поверхностно-активных глико- (фосфоенолпируват-синтетаза и фосфоенолпируват-карбоксикиназа) и аминоклипидов (НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа).

Максимальные показатели синтеза *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на глицероле наблюдались при наличии в среде дрожжевого автолизата и микроэлементов и в случае использования посевного материала, выращенного на среде без факторов роста. При наличии в глицеролсодержащей среде для получения инокулята и культивирования бактерий сульфата железа наблюдали снижение синтеза поверхностно-активных веществ, обусловленное ингибирующим влиянием Fe<sup>2+</sup> на активность энзимов биосинтеза их у штамма ИМВ В-7241.

Полученные данные могут быть основой для разработки новой технологии получения поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.

**Ключевые слова:** поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, органические кислоты, глицерол, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241.

**THE INFLUENCE OF ORGANIC ACIDS  
ON BIOSURFACTANT SYNTHESIS  
BY STRAIN *Acinetobacter calcoaceticus*  
IMV B-7241 CULTURE  
ON GLYCEROL MEDIUM**

T. P. Pirog<sup>1,2</sup>  
T. A. Shevchuk<sup>1</sup>  
M. A. Shulyakova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zaboltny Institute of Microbiology  
and Virology of National Academy of Sciences  
of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>National University of Food Technologies, Kyiv

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The possibility of intensification of biosurfactant synthesis by strain *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on glycerol in the presence of fumarate (C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid, precursor of gluconeogenesis) and citrate (lipid synthesis regulator) was found.

Complex addition into the medium with glycerol (1%, v/v) of fumarate and citrate (0,01–0,02%) was accompanied by increasing of the exocellular biosurfactant quantity in 2–2,5 times compared to cultivation of IMV B-7241 strain on medium without organic acids.

Increase in surfactant concentration was arisen from simultaneous functioning of two anaplerotic ways (both the glyoxylate cycle and phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase reaction) as well as enhancing in 3–5 times of enzyme activity of biosynthesis of surface-active glyco- (phosphoenolpyruvate synthetase and phosphoenolpyruvate carboxylase) and aminolipids (NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase).

Maximal characteristics of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 biosurfactant synthesis on glycerol were observed in the presence of yeast autolysate and microelements in the medium if inoculum was used that had been grown in medium without growth factors.

In the presence of ferrous sulfate in glycerol containing medium for inoculum obtaining and bacteria culturing, synthesis parameters of surfactants decreased due to Fe<sup>2+</sup> inhibitory effect on activity of enzyme biosynthesis of IMV B-7241 strain.

The obtained data are bases for development of new technology of biosurfactant synthesis by strain *A. calcoaceticus* IMV B-7241.

**Key words:** biosurfactants, intensification of synthesis, organic acids, glycerol, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241.