

Т.П. Пирог, доктор біол. наук

С.І. Антонюк, аспірант

О. В. Щербина, магістрант

О. С. Дугінець, магістрант

T. Pirog, S. Antonuk, O. Sherbina, O. Duginets

**ВПЛИВ СПОСОБУ ПІДГОТОВКИ ІНОКУЛЯТУ НА СИНТЕЗ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER*
CALCOACETICUS K-4**

**WAY OF INOCULUMS' PREPARATION OF THE STRAIN
ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4
AND IT'S INFLUENCE ON SURFACE ACTIVE SUBSTANCES'
SYNTHESIS**

Встановлено, що найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus K-4 спостерігалися за умови використання 10 % посівного матеріалу, вирощеного до середини експоненційної фази росту на середовищі з 1,0 % етанолу. За такого способу підготовки інокуляту умовна концентрація ПАР становила 4,1–4,2, а індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини досягав 76–78 %.

Ключові слова: *культивування, біосинтез, Acinetobacter calcoaceticus K-4, поверхнево-активні речовини, інокулят*

It was established that the highest indices of surface active substances' (SAS) synthesis were obtained in case of using 10 % inoculum that was

taken in the middle of exponential phase of development of culture on medium containing 0,5 % ethanol. Maximal SAS synthesis (with a conditional SAS concentration of 4,1–4,2; emulsifying activity of culture liquid dissolved in 50 times equal to 76–78 %) was detected in case of such way of inoculum preparation.

Key words: *cultivation, biosynthesis, Acinetobacter calcoaceticus K-4, surface active substances, inoculum*

Відомо, що тривалість лаг-фази під час періодичного культивування мікроорганізмів залежить від якості використовуваного посівного матеріалу [1]. Так, якщо джерела вуглецю і енергії у новому середовищі відрізняються від тих, що були у попередній культурі, то пристосування (адаптація) до нових умов може бути зумовлена синтезом нових ферментів, які раніше були непотрібні і тому не синтезувалися, що неминуче призводить до подовження процесу біосинтезу. З метою скорочення лаг-фази і тривалості біотехнологічних процесів зазвичай використовують посівний матеріал, вирощений до середини експоненційної фази росту на середовищі з таким самим джерелом вуглецю, що й для виробничої ферментації.

Раніше із забрудненого нафтою ґрунту нами було ізольовано штам бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 [2]. Штам депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером IMB B-7241. Встановлено умови культивування *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі, що забезпечують підвищення у три рази показників синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) [2]. У попередніх дослідженнях як посівний матеріал використовували культуру, вирощену на рідкому мінеральному середовищі з 2 % (об'ємна частка) етанолу до кінця експоненційної фази росту (70–72 год). Для біосинтезу ПАР штам K-4 культивували на середовищі, що містило таку ж саму

кількість етанолу. Оскільки тривалість вирощування *A. calcoaceticus* K-4 для одержання інокуляту удвічі менша, ніж для синтезу поверхнево-активних речовин, то й концентрація джерела вуглецю і енергії у середовищі у разі отримання посівного матеріалу повинна бути нижчою, ніж для біосинтезу ПАР. Цілком ймовірно, що із зниженням концентрації етанолу меншою виявиться й тривалість культивування штаму K-4 для одержання інокуляту, що дасть змогу підвищити ефективність процесу синтезу ПАР.

У зв'язку з наведеним вище мета роботи полягала у встановленні оптимального способу підготовки посівного матеріалу *A. calcoaceticus* K-4 для синтезу поверхнево-активних речовин.

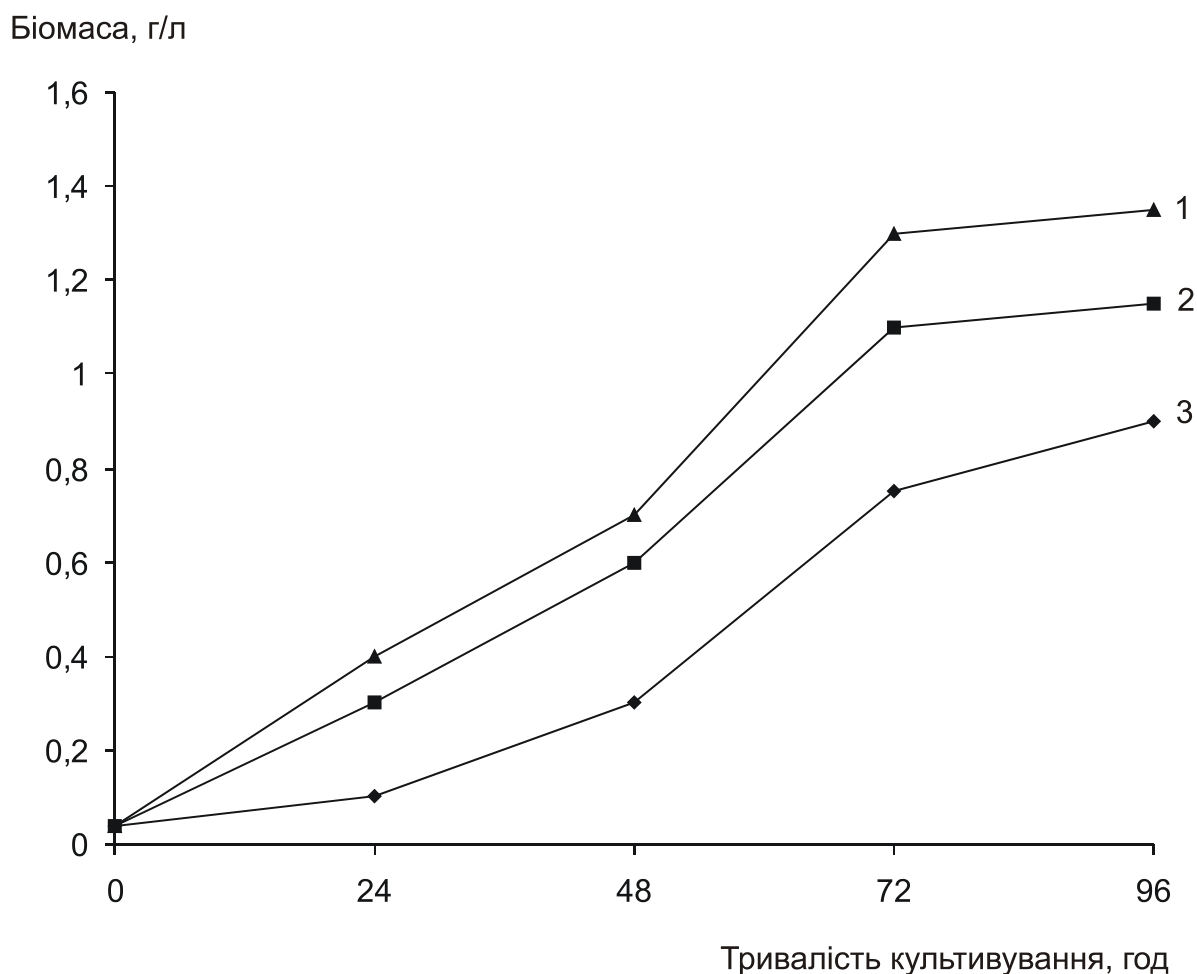
Штам *A. calcoaceticus* K-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,3; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка) [2]. Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували добову культуру *A. calcoaceticus* K-4, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з початку, середини і кінця експоненційної фази (22–24, 46–48 і 70–72 год росту), вирощену на середовищі наведеного складу, що містило етанол у концентрації 0,5; 1,0 і 2,0 % (об'ємна частка). Кількість інокуляту становила 5, 10 і 15 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 і 320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.

Біомасу визначали за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху масу за калібрувальним графіком. Кількість синтезованих поверхнево-активних речовин аналізували за показником умовної концентрації ПАР (ПАР*) та індексу емульгування (E_{24}) культуральної рідини, як описано нами раніше [2].

Індекс емульгування визначали для нативної і розбавленої у 50 разів культуральної рідини.

На першому етапі досліджували динаміку росту штаму К-4 залежно від концентрації етанолу у середовищі культивування (рисунок). У даних експериментах як посівний матеріал використовували одноклубову культуру, вирощену на ГКА.



Криві росту *A. calcoaceticus* К-4 залежно від концентрації етанолу у середовищі культивування.

Концентрація етанолу (% , об'ємна частка): 1 – 0,5; 2 – 1,0; 3 – 2,0.

Посівний матеріал вирощений на ГКА, вирощування здійснювали на качалці (220 об/хв.).

Як видно з наведених на рисунку даних, незалежно від концентрації етанолу у середовищі, початок експоненційної фази росту припадає на 24 год, середина і кінець – на 48 і 72 год відповідно. У разі культивування штаму K-4 на середовищі з 0,5 % етанолу на 96 год росту рівень біомаси є найвищим (1,3–1,4 г/л). За підвищення концентрації етанолу до 1,0 і 2,0 % спостерігається зниження рівня біомаси. Отже, зменшення кількості етанолу у середовищі вирощування *A. calcoaceticus* K-4 супроводжується інтенсифікацією процесу біосинтезу. Раніше таке явище ми спостерігали у процесі синтезу мікробного полісахариду етаполану на етанолі [3]. Було показано, що проміжні продукти окиснення етанолу й ацетальдегіду (НАДН та НАДФН) є інгібіторами активності ацетил-КоА-синтетази – ферменту, за допомогою якого ацетат залучається до метаболізму у *Acinetobacter* sp. B-7005 – продуцента етаполану.

Слід зазначити, що для мікроорганізмів, які утилізують джерела вуглецю, здатні пригнічувати ріст клітин, велике значення має спосіб подачі субстрату. Наприклад, у процесі культивування метанолокиснювальних бактерій зазвичай використовують дробний або безперервний спосіб подачі субстрату. Введенням додаткової кількості метанолу в кінці експоненційної фази росту *Methylomonas mucosa* вдалося збільшити концентрацію полісахариду в культуральній рідині, покращити його фізико-хімічні властивості та скоротити тривалість ферментації.

Зниження початкової концентрації етанолу до 0,5% з наступним дробним внесенням субстрату в процесі культивування штаму B-7005 дало змогу інтенсифікувати ріст і утворення полісахариду [3]. Ми припускаємо, що дробний спосіб подачі етанолу може бути одним з потенційних шляхів інтенсифікації синтезу поверхнево-активних *A. calcoaceticus* K-4.

У подальших експериментах для одержання посівного матеріалу штам К-4 вирощували на середовищі з 0,5 і 1,0 % етанолу.

Відомо, що рівень накопичення ПАР і тривалість процесу біосинтезу залежать від фізіологічного стану та концентрації інокуляту [4, 5]. Дослідження показали, що використання посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з 0,5 чи 1,0 % етанолу до середини і кінця експоненційної фази росту дає змогу підвищити синтез ПАР порівняно із застосуванням інокуляту з початку експоненційної фази або вирощеного на середовищі з 2,0 % етанолу (табл. 1).

Таблиця 1

**Залежність синтезу поверхнево-активних речовин
A. calcoaceticus К-4 від фізіологічного стану інокуляту**

Концентрація етанолу у середовищі для одержання інокуляту, %	Фаза росту інокуляту	Показники синтезу ПАР		
		ПАР*	E ₂₄ (%) культуральної рідини	
			нативної	розбавленої у 50 разів
0,5	Початок експоненційної	3,2±0,02	54±2,7	48±2,4
	Середина експоненційної	3,7±0,05	85±4,2	87±4,3
	Кінець експоненційної	3,6±0,04	70±3,5	60±3,0
1,0	Початок експоненційної	3,0±0,01	65±3,2	50±2,5
	Середина експоненційної	3,6±0,04	76±3,8	80±4,0
	Кінець експоненційної	3,6±0,04	65±3,2	70±3,5
2,0 (контроль)	Кінець експоненційної	3,4±0,03	75±3,7	70±3,5

П р и м і т к и. Концентрація інокуляту 5 %, вирощування здійснювали на качалці (320 об/хв.) упродовж 120 год.

Слід зазначити, що у разі використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту спостерігали ще й підвищення синтезу метаболітів з емульгувальними властивостями (табл. 1). Важливим з практичної точки зору є той факт, що індекс емульгування культуральної рідини після її розбавлення у 50 разів практично не змінювався.

Зважаючи на те, що концентрація клітин у посівному матеріалі з різних фаз росту є різною, на наступному етапі досліджували залежність синтезу ПАР від фізіологічного стану інокуляту, стандартизованого за початковою кількістю клітин (10^4 КУО/мл). Результати експериментів повністю підтвердили закономірності, наведені у табл. 1, що свідчить про залежність синтезу ПАР саме від фізіологічного стану посівного матеріалу, а не від кількості клітин у ньому.

У наступних дослідженнях визначали оптимальну для синтезу ПАР концентрацію посівного матеріалу (табл. 2).

У цих експериментах інокулят вирощували до середини експоненційної фази росту, що доцільніше з економічної точки зору порівняно із застосуванням інокуляту з кінця експоненційної фази (тривалість культивування становить 48 і 72 год відповідно).

Як свідчать дані, наведені у табл. 2, найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин (умовна концентрація ПАР 4,1–4,2) спостерігались за використання 10–15 % посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з 1,0 % етанолу. У той же час синтез метаболітів з емульгувальними властивостями був максимальним (індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини 90 %) за умови застосування 10–15 % інокуляту, одержаного на середовищі з 0,5 % етанолу. Звичайно ж, кількість інокуляту 10 % є економічно доцільнішою, ніж 15 %.

Таблиця 2

Вплив концентрації посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* K-4

Концентрація етанолу у середовищі для одержання інокуляту, %	Концентрація інокуляту, %	Показники синтезу ПАР		
		ПАР*	E ₂₄ (%) культуральної рідини	
			нативної	розбавленої у 50 разів
0,5	5	3,7±0,05	85±4,2	87±4,3
	10	3,8±0,06	92±4,6	90±4,5
	15	3,8±0,06	90±4,5	90±4,5
1,0	5	3,6±0,04	76±3,8	80±4,0
	10	4,2±0,08	86±4,3	76±3,8
	15	4,1±0,07	85±4,2	70±3,5
2,0 (контроль)	10	3,6±0,04	82±4,1	78±3,9

П р и м і т к и. Інокулят вирощений до середини експоненційної фази росту, культивування здійснювали на качалці (320 об/хв.). Тривалість біосинтезу становила 120 год.

Використання посівного матеріалу у концентрації 5 % супроводжувалося зниженням показників синтезу ПАР (табл. 2). Слід зазначити, що у даних експериментах тривалість культивування штаму K-4 становила 120 год. Цілком ймовірно, що й у разі застосування 5 % інокуляту значення ПАР* і E₂₄ могли б досягти максимуму за умови збільшення тривалості процесу біосинтезу.

У контрольному варіанті (концентрація етанолу у середовищі для одержання інокуляту 2 %) показник ПАР* становив всього 3,6, що нижче порівняно із використанням посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з меншою кількістю етанолу (табл. 2).

Нашими попередніми дослідженнями було показано, що максимальний синтез ПАР за умов росту штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі спостерігався за використання 5 % інокуляту з середини експоненційної фази росту, одержаного на середовищі з 0,5 % етанолу. За підвищення концентрації етанолу у середовищі для одержання посівного матеріалу синтез поверхнево-активних речовин досягав максимуму за збільшення тривалості культивування продуцента.

Висновки. Отже, у результаті проведеної роботи встановлено оптимальний спосіб підготовки посівного матеріалу (вирощування на середовищі з 1,0 % етанолу до середини експоненційної фази росту, концентрація 10 % від об'єму середовища), що дає змогу скоротити тривалість підготовки інокуляту та забезпечує найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі.

Список літератури

1. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
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 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 304-310.
3. Пирог Т.П., Корж Ю.В. Удосконалення біотехнології мікробного екзополісахариду етаполану на етанолі // Біотехнологія. – 2008. – Т.1, № 3. – С. 47–55.
6. Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 93, № 6. – P. 915 – 929.

7. Pal M.P., Vaidya B.K., Desai K.M., Joshi R.M., Nene S.N., Kulkarni B.D. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 36. – P. 747–756.

Надійшла до редколегії 09 жовтня 2009 р.