

579.2
732



В.С. ПІДГОРСЬКИЙ, Г.О. ІУТИНСЬКА, Т.П. ПИРОГ

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЙ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ



У монографії викладено фізіологічні основи регуляції та інтенсифікації технологій мікробного синтезу полісахаридів, поверхнево-активних речовин, авермектинів (полікетидних антибіотиків), бактеріальних добрив. Описано основні шляхи регуляції культивування мікроорганізмів у біотехнологічних процесах: встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів (температури, рН, природи і концентрації джерел вуглецю і азоту, співвідношення С/Н, способу подачі субстрату, режимів масообміну тощо); внесення у середовище культивування продуцентів екзогенних попередників біосинтезу; використання суміші енергетично нерівноцінних та енергетично дефіцитних ростових субстратів; визначення особливостей енергетичного і конструктивного метаболізму продуцентів, виявлення «сайтів метаболічного лімітування» і розробка підходів до їх усунення.

Для біотехнологів, мікробіологів, біохіміків, викладачів і студентів вищих навчальних закладів спеціальностей «Біотехнологія» та «Біологія».

Рецензент член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор Н.К. КОВАЛЕНКО

*Рекомендовано до друку вченою радою Інституту мікробіології
і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
(протокол № 6 від 4 червня 2009 р.)*

***Видання здійснене за державним контрактом
на випуск наукової друкованої продукції***

Науково-видавничий відділ медико-біологічної,
хімічної та геологічної літератури

Редактор *Н.С. Колосок*

© В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог, 2010
© НВП «Видавництво “Наукова думка”,
НАН України», дизайн, 2010

ISBN 978-966-00-0994-1

ПЕРЕДМОВА

На сьогодні, коли біосинтез практично важливих продуктів реалізується в промисловому масштабі, питання економії вуглецевих субстратів, зниження енерговитрат на процес мікробного синтезу, а також проблеми максимально повної трансформації вуглецевих субстратів у практично цінні метаболіти набувають особливої актуальності. Їх вирішення потребує глибоких знань фізіології, біохімії та енергетики продуцентів. Розробка на основі цих знань принципів регуляції біосинтезу дасть можливість реалізувати біотехнологічні процеси з найвищою ефективністю.

У монографії розглянуто фізіологічні основи інтенсифікації технологій мікробного синтезу поверхнево-активних речовин, полісахаридів, авермектинів, бактеріальних добрив. Для підвищення ефективності біотехнологій використано такі чотири підходи: встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів; внесення у середовище культивування попередників біосинтезу; використання суміші ростових і неростових субстратів; виявлення «вузьких» місць метаболізму й розробка підходів до їх усунення.

У праці не висвітлюються можливості генетичної модифікації штамів мікроорганізмів — продуцентів практично важливих метаболітів і використання методів метаболічної інженерії для вдосконалення продуцентів. Можливості метаболічної інженерії як одного з інструментів для усунення сайтів метаболічного лімітування розглядаються дуже коротко. Застосування таких генетичних підходів з метою підвищення ефективності технологій мікробного синтезу може бути предметом окремої монографії.

Встановлення оптимальних умов культивування мікроорганізмів, (температури, рН, природи і концентрації джерел вуглецю і азоту, співвідношення С/Н, способу подачі субстрату, режимів масообміну тощо), що забезпечують максимальний синтез цільового продукту, є першим і необхідним етапом розробки будь-

якої технології. Висвітленню цього питання присвячено перший розділ монографії.

У другому розділі розглядається використання попередників для інтенсифікації процесів мікробного синтезу. Слід зазначити, що існує багато тлумачень терміна «попередник біосинтезу» і різні дослідники використовують це поняття для визначення різних процесів. Тому на початку розділу наведено короткий огляд розуміння поняття «попередник» у біології та біотехнології.

Третій розділ присвячено використанню суміші ростових і неростових субстратів для підвищення синтезу біомаси, інтенсифікації росту мікроорганізмів і синтезу вторинних метаболітів (на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану). На сьогодні цей підхід практично не використовується дослідниками як один із способів збільшення синтезу продуктів метаболізму мікроорганізмів.

У четвертому розділі розглядається можливість інтенсифікації технологій мікробного синтезу полісахаридів і поверхнево-активних речовин на основі аналізу особливостей енергетичного і конструктивного метаболізму продуцентів, визначення сайтів можливого метаболічного лімітування і розробки підходів до їх усунення.

П'ятий розділ присвячено фізіологічним основам регуляції фізико-хімічних властивостей мікробних полісахаридів з метою одержання препаратів зі стабільними заданими властивостями залежно від галузі практичного використання.



РОЗДІЛ 1

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ МІКРОБНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Мета будь-якої біотехнології: базуючись на знанні біохімічних і фізіологічних процесів, у межах генетично детермінованих властивостей конкретного продуцента одержати максимальний вихід цільового продукту за мінімальних затрат. Одним із перших етапів під час розробки біотехнологій мікробного синтезу є встановлення оптимальних умов культивування продуцента, що забезпечують найвищий синтез цільового продукту.

Перелік основних факторів, що впливають на ріст і біосинтетичну здатність мікроорганізмів, наведено у табл. 1.1.

1.1. Особливості синтезу мікробних полісахаридів за різних умов культивування продуцентів

Упродовж останніх 20—30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) — високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів — є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем зумовила широке використання цих біополімерів у нафто- і гірничодобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості, сільському господарстві та медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна одержувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС зумовлена їхньою позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до

Таблиця 1.1

Основні фактори, що визначають ріст і біосинтетичну здатність продуцентів

Фактор	Роль у життєдіяльності продуцента	Метод керування
Склад і концентрація поживних речовин	Забезпечує процес енергетичного і конструктивного метаболізму	Визначення оптимального складу живильного середовища; підживлення під час ферментації; безперервність процесу; багатоетапність з урахуванням потреб продуцента за фазами розвитку та ін.
Концентрація продукту та інгібіторів	Сповільнює біохімічні реакції	Осадження продукту у міру накопичення; ферментація з діалізом; ферментація під розрідженням з випарюванням леткого продукту та ін.
pH	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій (інтервал 3,5—9,0)	Регулювання додаванням кислоти або лугу
Температура	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій (інтервал 20—70 °C)	Охолодження або підігрівання культуральної рідини за допомогою теплообмінників і температури субстратів, що подаються у біореактор
Осмотичний тиск або активність води	Визначає ступінь доступності води для мікроорганізмів (0,6—0,998)	Використання середовищ з оптимальною концентрацією поживних речовин або вологістю щільного середовища; підтримання на сталому рівні під час ферментації розведенням водою або додаванням окремих компонентів
Концентрація розчиненого кисню	Для аеробів забезпечує аеробний метаболізм; є акцептором H^+ ; інгібує розвиток анаеробів	Для аеробних процесів регулюється інтенсивністю аерації або додаванням до газової суміші кисню; за атмосферного тиску і 20 °C у 1 л середовища розчиняється 0,28 ммоль O_2 . Анаеробні процеси реалізують у безкисневому середовищі, що досягається продуванням N_2 і CO_2 або додаванням відновників (цистеїну, аскорбінової кислоти та ін.)

Фактор	Роль у життєдіяльності продуцента	Метод керування
Концентрація діоксиду вуглецю	Джерело вуглецю для автотрофів, для гетеротрофів під час росту на вуглеводах для функціонування анаплеротичних реакцій (карбоксилювання та ін.)	Для процесів з використанням автотрофних мікроорганізмів (наприклад, фотосинтезуючих) збагачення газової суміші CO ₂
Перемішування середовища	Рівномірний розподіл поживних речовин і біомаси по всьому об'єму середовища	Організують макро- і мікроперемішування в біореакторах за допомогою механічних мішалок, барботажних, циркуляційних та інших систем. Аерація сприяє перемішуванню, а піноутворення — флоатції продуцента; флокуляція сприяє осадженню біомаси
В'язкість середовища	Визначає дифузію поживних речовин і перемішування клітин продуцента	Регулювання компонентами середовища, характером і концентрацією біомаси, а також наявністю деяких полімерних екстрацелюлярних продуктів. В'язкість впливає на перемішування й аерацію, для чого потрібні спеціальні технічні засоби

температурної, окисної, механічної деструкції, проте піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад у нафтодобуванні.

Попит на мікробні ЕПС на світовому ринку є високим, що засвідчують як збільшення з року в рік обсягів виробництва першого мікробного ЕПС ксантану (продуцент *Xanthomonas campestris*), так і поява інших мікробних ЕПС, наприклад біозану (продуцент *Alcaligenes* sp.), склероглюкану (продуценти *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium* sp.), гелану (продуцент *Sphingomonas elodea*), емульсану (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*).

В останні роки опубліковано велику кількість праць, присвячених мікробним ЕПС, синтезованим екстремофільними бактеріями, і ролі ЕПС у життєдіяльності цих мікроорганізмів [103, 104, 114, 149, 165, 176, 244, 254—256, 260]. Встановлено, що ЕПС нафтоокиснювальних бактерій (представників родів *Rho-*

dococcus, *Gordonia*, *Acinetobacter*) забезпечують стійкість продуцентів до токсичних сполук (зокрема поліароматичних) і стимулюють процеси їх деградації, завдяки емульгувальним властивостям ці біополімери полегшують асиміляцію мікроорганізмами гідрофобних субстратів [114, 244, 254—256]. ЕПС галофільних бактерій роду *Halomonas* характеризуються здатністю до зв'язування сульфатів і катіонів, беруть участь у формуванні біоплівки [164, 260]. Екзополісахаридам бактерій, ізольованих з морських та океанічних глибин, гідротермальних джерел, антарктичних морських екосистем, притаманні унікальні фізико-хімічні властивості, завдяки чому ці біополімери можуть успішно конкурувати з відомими промисловими полісахаридами [103, 149, 164, 176].

Починаючи з середини 90-х років ХХ ст. і дотепер активно досліджуються ЕПС молочнокислих бактерій [67, 101, 124, 213, 214], що зумовлено широким використанням цієї групи бактерій у харчовій промисловості і для виробництва пробіотиків.

Здатність до синтезу ЕПС виявлено у багатьох мікроорганізмів, проте рівень синтезу цих полімерів коливається в широких межах як для різних продуцентів ЕПС, так і для одного продуцента за різних умов його культивування.

Дослідження динаміки росту мікробних клітин і утворення ЕПС в періодичному процесі показує, що максимальна питома швидкість їх синтезу здебільшого не збігається у часі з максимальною швидкістю росту продуцентів і досягається в стаціонарній фазі [8, 125, 126, 189, 215, 236, 243], що характерно для біосинтезу вторинних метаболітів.

Рівень біосинтезу вторинних метаболітів, у тому числі й ЕПС, значною мірою залежить від зовнішніх факторів. У зв'язку з цим у процесі розробки технології одержання мікробних ЕПС важливим і необхідним етапом є підбір оптимальних комбінацій різних параметрів культивування продуцентів.

Природа джерела вуглецевого живлення. В огляді Linton [151] проаналізовано зв'язок стехіометричних і кінетичних показників росту мікроорганізмів та утворення ЕПС, наведено розрахунки витрат АТФ на синтез біомаси і полісахаридів. Автор зазначає, що пошук найпродуктивніших біосинтетиків ЕПС слід здійснювати серед мікроорганізмів з низькою ефективністю росту, а оптимізація технології одержання мікробних ЕПС має бути пов'язана з правильним вибором субстрату (суміші субстратів) та умов культивування.

Більшість мікробних продуцентів ЕПС використовують вуглеводи як джерело вуглецю та енергії. При промисловому виробництві ЕПС як субстрати зазвичай застосовують продукти, отримані з цукрових буряків — меласу, цукровий сироп, сахарозу, або з кукурудзи — крохмаль, гідролізований крохмаль, глюкозний сироп, глюкозу, мальтозу [61, 140, 144, 165, 196]. Нещодавно з'явилися повідомлення про використання як субстрату для синтезу ЕПС стічних вод виробництв з переробки олив [53, 155].

Утворення ксантану *Xanthomonas campestris* спостерігається не лише на цих субстратах, а й за умов росту продуцента на середовищі з мальтозою, фруктозою, лактозою, галактозою [224, 259, 280]. У *X. campestris* pv. *campestris* B100 ідентифіковано гени, необхідні для асиміляції 15 різних вуглеводів [259]. Збільшення виходу ксантану було досягнуто у разі додавання до середовища з глюкозою або сахарозою пірвату (0,3 %), сукцинату (0,6 %) або 2-оксоглутарату (0,4 %) [239]. Вищі концентрації органічних кислот пригнічували синтез ксантану.

З розробленням технології рекомбінантних ДНК стало можливим вдосконалення існуючих та створення нових продуктивних штамів-продуцентів ЕПС, що дало змогу підвищити ефективність процесів біосинтезу та знизити їх вартість. Так, створено рекомбінантний штам *X. campestris*, здатний синтезувати ксантан на середовищі з молочною сироваткою [7]. Для цього гени *lacZY* *Escherichia coli*, які кодують β-галактозидазу і лактозопермеазу, перенесли в плазмиду з широким колом хазяїв так, щоб вони перебували під транскрипційним контролем промотора одного з бактеріофагів *X. campestris*. Цю конструкцію ввели у *E. coli*, а потім методом потрійного схрещування перенесли з *E. coli* у *X. campestris*. Трансформанти, які містили плазмиду, синтезували β-галактозидазу і лактозопермеазу, використовуючи лактозу як єдине джерело вуглецю, і синтезували ксантан на середовищі з глюкозою, лактозою і молочною сироваткою. Молочна сироватка використовується як субстрат для одержання гелану [97], а також ЕПС пропіоновокислих [88] і молочнокислих бактерій [67]. Водночас у працях [124, 213, 214] зазначається, що вихід ЕПС збільшувався за умов росту молочнокислих бактерій на середовищі з вуглеводами (глюкозою, фруктозою, манітолом). Підвищення синтезу екзополісахаридів молочнокислими бактеріями спостерігали у разі використання як субстрату молока [101].

Agrobacterium radiobacter NCIB 11883 синтезує ЕПС на середовищі, яке містить як джерело вуглецю глюкозу, сукцинат, глюконат, ксилозу, сорбіт, гліцерин, етанол [152], проте найвищий вихід ЕПС спостерігається при вирощуванні бактерій на глюкозі. За умов росту *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 на мальтозі вихід ЕПС від субстрату становив 85 %, у той час як на глюкозі — лише 50 % [195].

Бактерії *Azotobacter vinelandii* мають високий рівень біомаси за умов росту на середовищі з фруктозою, проте вихід альгінату у цьому разі невисокий [187]. За використання глюкози, маніту та мальтози кількість синтезованого альгінату збільшується. Найвищі показники за рівнем біомаси та ЕПС одержано під час культивування *A. vinelandii* на середовищі з сахарозою. Ноган зі співавт. [111] також зазначають, що вихід альгінату залежить від природи джерела вуглецевого живлення. Так, у фосфатлімітованому середовищі синтез альгінату спостерігається у разі використання як джерела вуглецю сахарози, проте не сорбіту. Автори встановили, що за умов росту продуцента на середовищі з сорбітом відсутні деякі ферменти синтезу альгінату. У праці Clementi зі співавт. [80] показано, що максимальна продукція альгінату спостерігається на середовищі з глюкозою. Вихід альгінату зменшується, якщо у середовище додають ацетат натрію.

Для синтезу альгінату псевдомонадами найсприятливішим субстратом є фруктоза [96]. Так, із досліджених 115 штамів 24 утворювали 10—17 г/л альгінату під час вирощування на середовищі з фруктозою, і тільки 7 штамів синтезували близько 10 г/л ЕПС за використання як ростового субстрату глюкози.

У літературі наведено відомості про синтез ЕПС галофільними бактеріями *Halobacterium mediterranei*, *Halobacterium volcanii* і *Halomonas eurihalina* [39, 162]. Глюкоза в концентрації 0,1—0,5 % стимулювала ріст *H. volcanii* та утворення ЕПС. З інших досліджених сахаридів подібний ефект спостерігався у разі використання сахарози та галактози [39]. *H. eurihalina* синтезує ЕПС на середовищі не тільки з глюкозою, а й з вуглеводнями, причому максимальний рівень ЕПС спостерігається за умов росту бактерій на глюкозі та гексадекані [162].

Галофільні бактерії, які належать до родини *Alteromonadaceae* (представники родів *Alteromonas* і *Idiomarina*), синтезують ЕПС на середовищі з глюкозою [164]. Декстран виявився сприятливішим, ніж сахароза, субстратом для синтезу ЕПС бактеріями, ізольованими з цукрових буряків [246].

Aureobasidium pullulans синтезує ЕПС на середовищі з вуглеводами, у тому числі й з глюкозаміном [78]. Сахароза є кращим (порівняно з глюкозою) субстратом для синтезу пулулану різними штамами *A. pullulans* [79, 234]. У праці [234] повідомляється, що нові ізольовані штами синтезували у 1,4—1,9 раза більше пулулану, ніж відомі раніше.

Синтез ЕПС *Enterobacter sakazakii* залежить від природи джерела вуглецю в середовищі [217]. Найвищий вихід ЕПС досягається у разі використання як ростового субстрату гліцерину або амінокислот.

У 1970—1977 рр. було опубліковано дані про утворення ЕПС на етиленгліколі та етанолі [107, 119—121, 248]. Так, штам *Arthrobacter simplex* var. *viscosus* за високої аерації за 72 год культивування трансформував 1,5 г етиленгліколю у 0,2 г полісахариду [107]. Танака зі співавт. [248] виділили з різних ґрунтів азотфіксувальні псевдомонади, які утилізують етанол, етиленгліколь, *n*-пропанол та утворюють високов'язкі полісахариди. *Alcaligenes faecalis* на мінеральних середовищах з етиленгліколем синтезував 6,2 г/л ЕПС, що становило 28 % заданого субстрату, а на *n*-парафінах вихід ЕПС досягав 34—38 % [119—121]. Кількість ЕПС, синтезованих *Mycobacterium lacticolum* і *M. cyaneum* на *n*-алканах, варіює у різних штамів і становить від 0,1 до 4,5 г/л [11, 40].

Наприкінці 70-х — на початку 80-х років ХХ ст. з'явилися перші повідомлення про емульсан — мікробний ліпополісахарид, синтезований *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 на основі етанолу [64, 211, 279, 281]. *A. calcoaceticus* RAG-1 синтезує емульсан на середовищі, яке містить як джерело вуглецю етанол, вуглеводні, жирні кислоти або ацетат [226, 279], причому найвищий вихід ЕПС (4—5 г/л) спостерігається на середовищі з етанолом. Етанол може бути частково замінений оцтовою кислотою. Продуктом емульсану є також *A. calcoaceticus* BD4, який росте на етанолі [127, 128]. Трохи пізніше було виділено два штами *A. calcoaceticus* A2 і HE5, які на середовищі з етанолом утворюють ЕПС, названий біодисперсаном [208, 210].

Здатність синтезувати у значних кількостях ЕПС виявлено у метилотрофних мікроорганізмів, причому як у облигатних метилотрофів, зокрема у представників родів *Methylomonas* [110, 247, 275], *Methylococcus* [8, 29], *Methylocystis* [130], *Methylophilus* [238], *Methylobacillus* [9, 42], *Hyphomicrobium* [125], так і у факультативних — *Pseudomonas* [48, 172], *Blastobacter* [17], *Methylobacterium* [71].

У деяких випадках саме метанол є найсприятливішим субстратом для синтезу ЕПС. Відомі культури, що утилізують різні джерела вуглецю, проте здатні синтезувати ЕПС тільки за умов росту на метанолі [84, 112].

Найактивнішими продуцентами ЕПС серед облигатних метаноласимілювальних бактерій є *Methylomonas mucosa* [108, 110, 277], *Methylophilus methylotrophus* [238], серед факультативних — *Pseudomonas polysaccharogenes* [48] і *Pseudomonas viscigena* [172, 201]. Ці культури адаптовані до високих концентрацій метанолу, характеризуються високою швидкістю росту, вихід ЕПС становить 40—44 % субстрату.

Наші дослідження показали, що для синтезу етаполану — комплексного екзополісахаридного препарату (продуцент *Acinetobacter* sp. 12S, депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером ІМВ В-7005) може бути використаний широкий набір як моно-, так і змішаних C_2 — C_6 -субстратів (етанол, ацетат, пропанол, піруват, C_4 -дикарбонові кислоти, вуглеводи — моно- і дисахариди, крохмаль, меляса та ін.) [8, 31—34]. Ця властивість вигідно відрізняє продуцент етаполану від відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують ЕПС тільки при вирощуванні на вуглеводах. Здатність *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 до утворення ЕПС на C_2 — C_6 -сполуках дає змогу розробити універсальну гнучку технологію одержання полісахаридів на основі широкого набору вуглецевих субстратів або комплекс різних технологій, кожна з яких може бути реалізована залежно від економічної доцільності, наявності та доступності того чи іншого субстрату, необхідності одержання ЕПС з певними фізико-хімічними властивостями.

Природа джерела азотного живлення. Як джерела азоту при одержанні мікробних полісахаридів зазвичай використовують кукурудзяні екстракти, соєве та бавовникове борошно, гідролізати дріжджів, а також мінеральні джерела — амонійні солі, нітрати, аміак [97, 140, 196]. У процесі культивування продуцента альгінату *Azotobacter vinelandii* як джерело азотного живлення використовують газоподібний азот [272]. Ризобії синтезують ЕПС на середовищі, яке містить дріжджовий екстракт у концентрації до 3 г/л [82, 147]. У праці [235] зазначається, що найважливішими факторами, які впливають на синтез ЕПС ризобіями, є природа і концентрація джерел азоту, фосфору і сірки. Наявність дріжджового екстракту (0,5 %) в оптимізованому середо-

вищі для культивування *Gluconobacter oxydans* Л-1 дало змогу забезпечити вихід левану на рівні 95 % теоретично можливого [43].

У результаті вивчення впливу різних факторів на утворення альгінату *Azotobacter vinelandii* встановлено, що вихід ЕПС залежить від концентрації і типу органічного джерела азотного живлення, зокрема від типу пептону [72]. Оптимізоване середовище, на якому спостерігається максимальний вихід глюкану (продуцент *Aureobasidium pullulans*), містить сечовину і пептон як джерела азоту [46]. Максимальний синтез ЕПС *Ganoderma resinaceum* DG-6556 спостерігали за наявності у середовищі культивування пептону як джерела азоту [133]. Для синтезу гелану використовують як органічні, так і неорганічні джерела азоту [97]. Введення в середовище культивування *A. pullulans* і *Xanthomonas campestris* 8162 меляси дало змогу виключити внесення органічного джерела азоту [5, 144]. Для утворення емульсану середовище має містити азотовмісні компоненти (сульфат і хлорид амонію, нітрати або сечовину) у кількості, що перевищує питому потребу культури, оскільки синтезований полімер складається в основному з похідних аміноцукрів [279].

Під час культивування метилотрофів — продуцентів ЕПС — використовують мінеральні джерела азоту — амонійні солі [48, 112]. Для факультативних метилотрофів бажана наявність у середовищі дріжджового екстракту. Так, вихід ЕПС на середовищах з дріжджовим екстрактом становить 25—44, без нього — 10—20 % кількості субстрату. За наявності дріжджового екстракту кількість синтезованих метилотрофами ЕПС становить 3—5 г/л, без джерела факторів росту — лише 1—2,5 г/л. Для утворення ЕПС дріжджами *Rhodotorula acheniorum* найсприятливішим джерелом азоту є сульфат амонію [102]. Синтез етаполану відбувається за наявності як органічного, так і неорганічного азоту, проте сприятливішими є мінеральні джерела (амонійні, нітратні, амонійно-нітратні) [8].

Співвідношення джерел вуглецевого і азотного живлення. Для оптимального синтезу ЕПС суттєве значення має співвідношення вуглецю і азоту (С/Н) у середовищі культивування продуцента [5, 8, 97, 99, 140, 148, 152, 217, 238, 243]. Так, на прикладі *Methylophilus methylotrophus* показано, що швидкість синтезу ЕПС і вихід його від спожитого метанолу залежать від значення С/Н [238]. Оптимальним для утворення ЕПС цими бактеріями є співвідношення С/Н = 12. Вихід ЕПС *Enterobacter sakazakii* мак-

симальний за $C/N = 20$ [217]. Оптимальним для синтезу ксанта-ну є співвідношення $C/N = 14-20$ [5]. У процесі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 на середовищі з соєвою олією максимальний вихід емульсану спостерігається за співвідношення вуглець/азот, що дорівнює 7—8 [226].

Linton зі співавт. [153] досліджували здатність бактерій *Methylophilus* sp. NC1B 12047, *Pseudomonas extorquens* NC1B 9399 і дріжджів *Pichia pastoris* синтезувати ЕПС на середовищі з метанолом. Встановлено, що тільки *Methylophilus* sp. синтезував ЕПС в умовах лімітування азотом за хеомостатного культивування. Оптимальним для синтезу ЕПС було співвідношення метанол/сульфат амонію, що становило 10 : 1. Два інших досліджуваних мікроорганізми реагували на ліміт азоту збільшенням окиснення метанолу до CO_2 [153].

Досліди з хеомостатною культурою *Pseudomonas mendocina* продемонстрували, що найефективнішою умовою утворення альгінату є ліміт за азотом, причому зі збільшенням глибини лімітування синтез альгінату підвищується [223]. За N-лімітування *Pseudomonas aeruginosa* у безперервній культурі також збільшується вихід альгінату [171]. Мутант метилотрофної бактерії *Methylobacterium rhodesianum* за лімітування азотом утворює меншу кількість внутрішньоклітинного поліоксibuтирату, а синтез ЕПС при цьому збільшується в 10 разів [71]. За низьких швидкостей розбавлення середовища ($D < 0,1 \text{ год}^{-1}$) в умовах лімітування азотом підвищується вихід курдлану [193]. Проте за підвищення значень D синтезувався інший ЕПС.

Виявилося несподіваним, що в разі лімітування вуглицем *Azotobacter vinelandii* синтезував ЕПС з такою самою високою швидкістю, як і в умовах лімітування іншими субстратами [189]. Аналогічні результати одержано при культивуванні *Xanthomonas campestris* в умовах лімітування росту вуглеводами. Водночас за ліміту глюкози не спостерігали синтезу ЕПС *Pseudomonas* sp., а за лімітування амонієм 43 % використаної глюкози перетворювалось на полісахарид, концентрація якого досягала 7,5 г/л.

Слід зазначити, що культивування продуцентів ЕПС у хеомостаті за лімітування вуглицем найчастіше призводить до появи немукондних варіантів і виродженню культури як продуцента ЕПС [242]. Проте в літературі є відомості, що в безперервній культурі ($D = 0,05 \text{ год}^{-1}$) на NH_4 -лімітованому середовищі також можливе виникнення немукондних варіантів [267]. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* в таких умовах упродовж

12 діб кількість синтезованого альгінату і вміст мукоїдних клітин зменшувались практично до нуля. При цьому спостерігалось зниження активності ферментів, які беруть участь у синтезі альгінату.

Відомо, що дуже низький вміст азоту в середовищі культивування продуцентів ЕПС призводить до зниження рівня біомаси, зміни фізіологічного стану клітин та зменшення виходу ЕПС від субстрату, хоча вихід ЕПС щодо біомаси може збільшуватися [242].

Наші дослідження показали, що за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші етанолу і глюкози «глибина» лімітування джерелом азотного живлення є одним із факторів, які регулюють спрямованість біосинтетичних процесів у бік утворення ЕПС. Так, вивчення впливу концентрації джерела азоту (нітрату амонію) в середовищі культивування бактерій на синтез ЕПС показало, що, незалежно від вмісту етанолу та глюкози в середовищі, у разі зниження концентрації азоту суттєво зростає вихід ЕПС від біомаси та субстрату [32].

Спосіб подачі субстрату. Для мікроорганізмів, які утилізують джерела вуглецю, здатні пригнічувати ріст клітин, велике значення має спосіб подачі субстрату. У процесі культивування метанолокиснювальних бактерій зазвичай застосовують дробний або безперервний спосіб подачі субстрату. Введенням додаткової кількості метанолу в кінці експоненційної фази росту *Methylobacterium* *micosa* [276] вдалося підвищити концентрацію ЕПС в культуральній рідині, поліпшити його фізико-хімічні властивості та скоротити тривалість ферментації.

Дослідження особливостей метаболізму етанолу у продуцента етаполану показало, що за концентрації субстрату у середовищі понад 1 % (об'ємна частка) спостерігається накопичення ацетату в культуральній рідині, що призводить до пригнічення росту та синтезу ЕПС [34]. Встановлено, що проміжні продукти окиснення етанолу та ацетальдегіду (НАДН та НАДФН) є інгібіторами активності ацетил-КоА-синтетази — ферменту, за допомогою якого ацетат залучається до метаболізму. Зниження початкової концентрації етанолу до 0,5 % з наступним дробним внесенням субстрату в процесі культивування бактерій дало змогу інтенсифікувати ріст бактерій і утворення ЕПС. Для проведення біохімічних досліджень продуцента етаполану використовували мутантний штам бактерій, який не синтезує ЕПС, ос-

кільки клітини ЕПС-синтезуючого штаму неможливо було відділити від високов'язкого полісахариду з великою молекулярною масою. Результати досліджень регуляції ацетил-КоА-синтетази у мутантного штаму було використано для вдосконалення технології одержання етаполану на основі етанолу.

Вплив способу подачі субстрату на вихід ЕПС описаний для вуглеводокиснювальних бактерій *Xanthomonas* [280], *Alcaligenes* [193], грибів *Aureobasidium* [229] і *Ganoderma resinaceum* [133]. Збільшення виходу ксантану було досягнуто за поступового додавання глюкози зі сталою швидкістю до концентрації її в середовищі 7 %. Збільшення швидкості утворення курдлану спостерігалось, якщо в кінці експоненційної фази росту *Alcaligenes faecalis* додатково вносили глюкозу до кінцевої концентрації 6 %. Вихід пулулану вдалося підвищити у 2 рази (до 58 г/л) за дворазового внесення сахарози (по 2,5 %) у процесі культивування продуцента за початкової концентрації субстрату 5 %. Максимальна швидкість синтезу глюкану у *Schizophyllum commune* та *Sclerotium glucanicum* досягається в умовах періодичного культивування за періодичної подачі субстрату [199].

Джерела фосфору. Як джерела фосфору зазвичай використовують одно- та двоосновні фосфати калію і натрію. Під час культивування метилотрофів з метою одержання ЕПС японські дослідники рекомендували середовище з високим вмістом фосфорних солей: K_2HPO_4 — 5,5 і Na_2HPO_4 — 10,0 г/л [15]. Використання фосфорних солей у таких концентраціях дало змогу іншим авторам провести виділення і відбір продуцентів ЕПС, а також забезпечувало високий рівень синтезу ЕПС як у моно-, так і у змішаних культур мікроорганізмів [6, 8].

Використання гліцерофосфату натрію, який краще засвоюється бактеріями порівняно з неорганічними фосфорними солями, привело до збільшення виходу ЕПС у *Methylomonas mucosa* [278]. Гліцерофосфат натрію як єдине джерело фосфору або в поєднанні з неорганічними солями запобігає втратам інгредієнтів живильного середовища, які утворюють нерозчинні осадки під час стерилізації, а також менше залужнює середовище порівняно з неорганічними фосфатами. Використання гліцерофосфату в середовищі культивування *Pseudomonas aeruginosa* — продуцента альгінату описано також Кріг з співавт. [138]. Автори зазначають, що лімітування фосфатом інгібувало синтез альгінату. Однак за зняття лімітування додаванням однакової

кількості (24 ммоль) K_2HPO_4 , гліцерофосфату або фосфорилхоліну найпомітніша стимуляція біосинтезу альгінату (до 6 г/л) спостерігалась для фосфорилхоліну — у 3 рази вища, ніж у разі використання інших сполук.

У праці [273] зазначається, що синтез альгінату підвищується в 4 рази за зниження вмісту фосфатів в середовищі до 0,1—0,8 ммоль, тобто майже в 10 разів порівняно з концентрацією цих солей, яка використовувалась іншими дослідниками. У деяких випадках за концентрації фосфатів понад 0,5 і нижче 0,2 ммоль має місце зменшення синтезу ЕПС метилотрофними бактеріями [47]. Достатньо низькі концентрації фосфору в середовищі бажані під час культивування бактерій роду *Klebsiella* — продуцентів ЕПС [100]. Водночас вихід ЕПС *Pseudomonas* sp. GSP-910 збільшується, якщо вміст фосфатів у середовищі підвищується до 80 ммоль [158]. Під час вивчення впливу різних факторів на утворення альгінату і поліоксибутирату *Azotobacter vinelandii* у періодичній культурі встановлено, що за високої концентрації фосфатів в середовищі (7,5 г/л) збільшується вихід альгінату (до 6,5—7 г/л), а вміст поліоксибутирату зменшується до 40 % і становить 1 г/л [72].

Іони металів. Відомо, що іони металів необхідні для росту мікроорганізмів і синтезу ними ЕПС [140, 242], проте питання їх впливу на синтез ЕПС вивчені недостатньо.

На процес синтезу ЕПС у деяких випадках суттєво впливають Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} . Так, після додавання марганцю (500 мкмоль) у середовище культивування *Rhizobium meliloti* кількість синтезованих ЕПС збільшується у понад 4 рази (до 2,5 г/л) [56]. За наявності 100 мкмоль хлориду марганцю або сульфату алюмінію кількість ЕПС, утворюваних *Rhizobium trifolii* за умов росту на рідкому манітно-дріжджовому середовищі, підвищується на 12 і 7 % відповідно [57]. Вплив іонів марганцю на синтез ЕПС ризобіями зазначали також Appanna і Preston [58]. На думку авторів, іони марганцю та алюмінію впливають на активність ферментів, які беруть участь у синтезі ЕПС у ризобій [57]. За наявності у середовищі 5 мМ MnCl_2 підвищується синтез ЕПС *Ganoderma resinaceum* [133]. Іони марганцю позитивно впливають на синтез гелану [97].

Експериментальні дані, одержані Р.І. Гвоздяком зі співавт. [5], показали, що додавання мікроелементів (в певній концентрації та поєднанні) збільшує вихід і поліпшує тиксотропні властивості ксантану. Lee зі співавт. [146] встановили, що додавання

іонів заліза (III) у періодичну культуру *Xanthomonas campestris* супроводжувалось підвищенням рівня біомаси і зниженням синтезу ксантану. Вихід ксантану значно збільшувався за наявності цинку і магнію [177]. Підвищення концентрації заліза від 0 до 50 мкмоль у середовищі культивування *Azotobacter chroococcus* B-8 супроводжувалось зменшенням виходу ЕПС у 16 разів [94]. Водночас деякі метилотрофні бактерії — продуценти ЕПС характеризуються більшим синтезом полісахаридів за наявності в середовищі 5—10 мг/л заліза [17, 48, 125, 126, 276]. Для кращого засвоєння іонів заліза в середовище додають хелатувальні агенти — лимонну і 2,3-дигідробензойну кислоти, ЕДТА. Оптимальна концентрація хелатувальних агентів становить 0,0001—0,02 %.

Під час дослідження впливу кальцію (0,068—2,72 ммоль) на утворення альгінату бактеріями *Azotobacter vinelandii* і *Pseudomonas aeruginosa* встановлено, що низькі концентрації пригнічують ріст, особливо за високих швидкостей розбавлення середовища [54]. З підвищенням концентрації Ca^{2+} у культуральній рідині синтез альгінату інтенсифікується; при цьому спостерігається також поліпшення його реологічних властивостей. Автори вважають, що утворення більш гетерополімерних структур у цьому разі зумовлене позаклітинною епімеризацією альгінату (зокрема ізомеризацією полімануронової кислоти до гулууронової), на яку впливає кальцій [54, 55]. Підвищення синтезу альгінату бактеріями *P. aeruginosa* спостерігалось за збільшення вмісту Mg^{2+} у середовищі [243].

Дослідження синтезу альгінату *Azotobacter vinelandii* в умовах хемостатного культивування показало, що вихід ЕПС збільшується, якщо лімітується вміст MoO_4^{2-} , K^+ [189]. В умовах лімітування за Mg^{2+} спостерігали зменшення виходу ксантану [83].

Стимулювання Fe^{3+} синтезу пулулану зазначили Reeslev і Jensen [202]. Для синтезу емульсану *Acinetobacter calcoaceticus* потрібна наявність у середовищі двовалентних катіонів Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} у кількості 1—100 ммоль [279].

Температура і рН. Температура і рН середовища, оптимальні для росту продуцента, здебільшого є оптимальними і для синтезу ЕПС. У ряді випадків зниження температури нижче оптимальної супроводжується підвищенням концентрації ЕПС [6, 13, 97, 140, 215], що можна розглядати як прояв захисних функцій ЕПС у відповідь на неоптимальні умови існування продуцента. Крім того, цілком можливо, що у деяких мікроорганізмів температур-

ний оптимум ферментів, які беруть участь в утворенні (чи полімеризації) ЕПС, відрізняється від оптимуму ферментів, що використовуються для синтезу біомаси. У *Pseudomonas* sp. GSP-910 оптимум температури для синтезу ЕПС становить 25 °С, для росту — 18 °С [158]. Для мутантного термофільного штаму *Methylomonas methanolica* оптимальною для синтезу ЕПС є температура 37 °С, для росту — 35 °С [106]. Williaws і Wimpenny [266] встановили, що в умовах безперервного культивування *Pseudomonas* sp. NC1B 11264 концентрація біомаси залишається однакою в діапазоні температури 20—37,5 °С, тоді як ефективність перетворення глюкози на полісахарид і в'язкість культуральної рідини суттєво змінюються. Максимум утворення ЕПС спостерігається при 30 °С.

Для мікроорганізмів-продуцентів ЕПС на метані велике значення має термотолерантність, оскільки ріст на метані супроводжується виділенням більшої кількості тепла, ніж на метанолі [108]. Зниження температури культивування *Methylococcus thermophilus* нижче оптимальної супроводжується збільшенням виходу ЕПС [8]. Температура культивування продуцентів гелану та склероглюкану впливає на вихід ЕПС [99, 262]. Зі зниженням температури спостерігається утворення побічних продуктів: щавлевої, яблучної та фумарової кислот [262, 263]. Процес утворення ЕПС у гало- і термотолерантних бактерій роду *Bacillus* є термозалежним [192]. Молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis* синтезують два ЕПС — нейтральний і кислий [161]. В умовах хемостатного культивування утворення нейтрального ЕПС зменшується з підвищенням температури (з 65 мкг/мл при 25 °С до 18 мкг/мл при 30 °С). Концентрація кислого ЕПС (10 мкг/мл) не змінюється в діапазоні температур 20—30 °С. Зниження температури до 20 °С супроводжувалось підвищенням рівня синтезу ЕПС у *Lactobacillus pentosus* LPS26 [214].

Синтез ЕПС у мікроорганізмів чутливіший до змін рН, ніж синтез біомаси. Підтримання рН сталим (на рівні 7,0) упродовж процесу культивування *Pseudomonas* sp. EPS-5028 сприяло підвищенню синтезу ЕПС [160]. Під час культивування *Azotobacter vinelandii* рН середовища знижується до кінця процесу з 7,4 до 5,5 [273]. При вирощуванні бактерій в умовах сталого рН, який дорівнює 7,0—8,2, кількість синтезованих ЕПС збільшується у 2—3 рази. Для створення оптимального для синтезу альгінату значення рН рекомендують введення в середовище культиву-

вання буфера, наприклад *трис*-(гідроксиметил)-амінометану. Підвищення виходу ЕПС у процесі культивування метилотрофних бактерій на середовищі Кодама [15] також зумовлене сталим нейтральним значенням рН упродовж процесу внаслідок наявності в середовищі фосфатного буферу.

У періодичній культурі *Aureobasidium pullulans* кількість дріжджоподібних клітин збільшується за підвищення початкового значення рН від 3,5 до 6,0 [109]. Одночасно зростає кількість синтезованого пулулану, тоді як рівень біомаси не змінюється. Крім того, за підтримання рН у межах 5,0—6,3 синтез меланіну клітинами є мінімальним, що значно полегшує очистку пулулану. Як і в умовах періодичної культури, за хемостатного культивування *A. pullulans* морфологія клітин визначається рН середовища: низькі значення рН є сприятливими для утворення ниткоподібних форм [170]. Оптимальним для біосинтезу пулулану було значення рН 4,5, за якого кількість дріжджоподібних і ниткоподібних клітин становила 50 %. Автори вважають, що в хемостатній культурі ниткоподібні клітини також синтезують пулулан за низьких значень рН середовища. Зі зростанням рН рівень біомаси підвищується, проте вихід пулулану зменшується.

Під час культивування *Lactobacillus casei* CRL 87 в умовах постійного рН середовища, який дорівнює 6,0, кількість синтезованих ЕПС була максимальною і становила 488 мг/л [174]. Проте вихід ЕПС від біомаси був найвищим за рН 4,0. Максимальний синтез ЕПС *Lactobacillus pentosus* LPS26 спостерігали за рН 6,0 [214].

У літературі зазначається стимулююча дія органічних кислот (пірувату, цитрату, сукцинату, 2-оксоглутарату) на утворення ксантану *Xanthomonas campestris* [239]. Автори вважають, що вплив органічних кислот пов'язаний із встановленням сприятливого для синтезу ксантану значення рН. Аналогічний ефект має місце при введенні в середовище культивування *X. campestris* фумарової кислоти [5]. У цьому разі спостерігається збільшення виходу ксантану з 6,0 до 9,1 г/л.

Аерація. Переважна більшість мікроорганізмів-продуцентів ЕПС є строгими аеробами, рідше — факультативними анаеробами. Анаеробні бактерії *Clostridium perfringens* здатні продукувати ЕПС у процесі культивування в строго анаеробних умовах [242]. *Acetobacter xylinum* у статичних умовах культивування продукує більше целюлози, ніж за аерації [93]. Рівень дихання бактерій впливає на інтенсивність синтезу ЕПС: за активнішого дихання

кількість ЕПС зменшується, оскільки більше вуглецевого субстрату перетворюється на CO_2 .

Потреба в розчиненому кисні строго специфічна для кожного продуцента, вона встановлюється експериментально і змінюється на різних фазах росту. Для деяких культур високий рівень аерації є необхідним у фазі експоненційного росту і небажаним у стаціонарній фазі [189, 215, 236]. Для інших продуцентів ЕПС, навпаки, високий рівень аерації є необхідним упродовж всього процесу культивування [112].

Слід зазначити, що концентрація розчиненого кисню в середовищі має суттєве значення при одержанні ЕПС на основі C_1 — C_2 -сполук. На початку процесу культивування вона не повинна перевищувати 10—20 % насичення повітрям. За вищих концентрацій розчиненого кисню спостерігається інгібування росту мікроорганізмів, що може бути пов'язане не тільки з накопиченням токсичних похідних кисню, а й з утворенням токсичних продуктів окиснення C_1 — C_2 -сполук, які пригнічують ріст продуцента.

Під час вивчення впливу умов культивування на ріст і утворення ЕПС *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 встановлено, що на початку процесу клітини чутливі до високих концентрацій розчиненого кисню. Так, рівень pO_2 не має перевищувати 20—30 % насичення повітрям (за концентрації розчиненого кисню в середовищі понад 40 % спостерігається уповільнення, а понад 50 % — пригнічення росту культури) [8, 30]. У разі додавання синтетичного антиоксиданту іонолу (0,01 %) у середовище під час вирощування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 у ферментаторі в умовах високої концентрації розчиненого кисню (50 % насичення) була відсутня лаг-фаза, збільшувались швидкість росту бактерій і синтез ЕПС, скорочувалась тривалість культивування.

Аналогічні закономірності встановлено при реалізації від'ємно доливного способу культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 без внесення іонолу. У цьому разі пригнічення росту бактерій не спостерігали і вищих значень pO_2 (до 80 % насичення). Більше того, у процесі вирощування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 від'ємно-доливним способом в умовах високих концентрацій розчиненого кисню (70—80 % насичення) зростала максимальна питома швидкість росту і синтезу ЕПС, а також зміщувався час їх досягнення у більш ранню ростову фазу. Очевидно, в таких

умовах захист клітин від токсичної дії кисню зумовлений високою (15—20 %) концентрацією інокуляту зі стаціонарної фази росту (високов'язкої культуральної рідини, що містить ЕПС). На нашу думку, це явище можна вважати проявом адаптивних механізмів, що дають змогу популяції вижити за несприятливих умов.

Зі зростанням швидкості перемішування від 200 до 800 об/хв вихід пулулану збільшувався у 4 рази [168]. Наявність взаємозв'язку між рівнем аерації, морфологічними формами продуцента і біосинтезом пулулану зазначали Simon зі співавт. [232]. Вихід альгінату також значною мірою залежить від концентрації розчиненого кисню в середовищі культивування продуцента [72, 223]. За високої концентрації кисню спостерігається зниження швидкості синтезу альгінату. При цьому більша частина вуглецю перетворюється на CO_2 . За нестачі кисню вихід ЕПС також зменшується, при цьому у клітинах *Azotobacter vinelandii* накопичується надлишок полі- β -гідроксибутирату. Так, у періодичній культурі на безазотному середовищі за швидкості перемішування 120 об/хв вихід альгінату становив лише 1 г/л, а кількість полі- β -гідроксибутирату перевищувала 50 % маси біомаси [72]. Якщо швидкість перемішування збільшувалась до 280 об/хв, вихід альгінату підвищувався до 6,5—7,0 г/л; вміст полі- β -гідроксибутирату в клітинах знижувався до 30 %.

Можливість регуляції біосинтезу ЕПС зміненням рівня аерації (з використанням різних типів мішалок і способів перемішування) показано в працях Rau зі співавт. [199], А.І. Осадчої зі співавт. [25], Chi і Zhao [79], Borges зі співавт. [70]. Використання турбінної мішалки під час культивування продуцентів пулулану підвищує показник pO_2 , що позитивно впливає на синтез полімеру [79]. Дослідження синтезу ксантану під час культивування продуцента в ферментаторі показало, що максимальний вихід ЕПС спостерігався за швидкості перемішування 150 об/хв у перші 48 год і 280 об/хв упродовж решти часу, необхідного для досягнення найвищої в'язкості [206]. Встановлено, що оптимальна аерація становить 0,5 л/л середовища за 1 хв, а швидкість споживання кисню варіює від 0,4 ммоль O_2 /л за 1 хв за швидкості перемішування 150 об/хв до 1,5 ммоль O_2 /л за 1 хв за 280 об/хв. Найвищий рівень синтезу ксантану *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* 101 спостерігали за швидкості перемішування 300 об/хв і високої концентрації розчиненого кисню [70].

Показано, що питома швидкість утворення β -1,3-глюкану у *Alcaligenes faecalis* залежить від швидкості споживання кисню клі-

тинами, яка в умовах оптимального синтезу полімеру становить 50 ммоль O_2 /л за 1 год [145]. Для синтезу емульсанів з етанолу потік кисню має бути 190 ммоль O_2 /л за 1 год і вище [279].

Як встановлено Linton зі співавт. [153], під час культивування *Methylophilus* sp. в умовах лімітування киснем полісахарид утворюється в низьких концентраціях, однак за збільшення глибини лімітування концентрація ЕПС в культуральній рідині підвищується. Утворенню ЕПС *Methylomonas methanolica* MV 13 сприяють висока температура культивування, низька швидкість росту і лімітування киснем [106]. Причому кисень є найсуттєвішим лімітувальним фактором для максимального виходу ЕПС за надлишку вуглецю і азоту як у безперервному, так і періодичному процесі культивування продуцента. Southgate і Goodwin [238] встановили, що *Methylophilus methylotrophus* за безперервного культивування в умовах лімітування метанолом синтезує ЕПС зі швидкістю 18 мг/год на 1 г біомаси. За лімітування росту бактерій киснем або азотом цей показник збільшується у 3 і 4 рази відповідно.

Linton зі співавт. [153], а також Southgate і Goodwin [238] вважають, що синтез ЕПС з метанолу є ефективним способом видалення формальдегіду при обмеженості дихання клітин за умови, що утворення ЕПС не призводить до загального надсинтезу відновлювальних еквівалентів. Таким чином, синтез ЕПС можна розглядати як відповідну реакцію і захисний фактор клітин на дію токсичних метанолу і формальдегіду.

На стадії утворення ЕПС різко підвищується в'язкість культуральної рідини, що ускладнює доступ кисню до клітин. Крім того, перенесення великих мас кисню за періодичного культивування може призвести до накопичення в середовищі токсинів і загибелі клітин [159, 215]. В умовах безперервного культивування цей фактор має менше значення. На ефективність процесів аерації можуть суттєво впливати конструкція ферментатора і тип перемішувального пристрою. Розроблено ферментатор, оснащений низькошвидкісною мішалкою незвичайної конструкції, який дає змогу вести процес без ліміту за киснем [159, 189]. Створено також тип реактора для одержання ксантану, який відрізняється від традиційних реакторів тим, що мішалка має петлеподібну форму і перемішування здійснюється ерліфтным способом [188]. Використання такого реактора дає змогу підвищити продуктив-

ність біосинтезу ЕПС і скоротити тривалість культивування продуцента.

Культивування продуцентів ЕПС у періодичному та безперервному режимах. У мікроорганізмів-продуцентів ЕПС синтез полісахаридів може бути пов'язаний з ростом, наприклад у *Methylocystis parvus* OBVP [112], частково пов'язаний — у *Xanthomonas*, *Methylomonas methanolica* [106, 242], і не пов'язаний — у *Alcaligenes*, *Rhizobium* [242, 274].

У більшості мікроорганізмів час досягнення максимальної питомої швидкості росту і синтезу ЕПС не збігається. Зазвичай максимальна швидкість синтезу ЕПС спостерігається в кінці експоненційної — початку стаціонарної фази росту. Проте концентрація ЕПС у культуральній рідині досягає найвищого рівня в кінці періодичного процесу, тобто в стаціонарній фазі. Залежно від умов культивування тривалість періодичного процесу для різних продуцентів ЕПС становить від 24 до 120 год.

Визначення фази росту продуцента, в якій швидкість синтезу ЕПС є максимальною, а також фази росту, в якій досягається максимальна концентрація ЕПС, дасть змогу встановити оптимальну тривалість процесу за періодичного культивування. Зіставлення часу досягнення максимальної швидкості росту і синтезу ЕПС дає можливість визначити оптимальну швидкість розбавлення середовища за безперервного культивування. Оскільки максимальна швидкість синтезу ЕПС у продуцентів здебільшого не збігається у часі з максимальною швидкістю їх росту, можна передбачити, що для оптимального виходу ЕПС вести безперервний процес за високих швидкостей розбавлення середовища нецільно.

Максимальна питома швидкість утворення емульсану у *Acinetobacter calcoaceticus* спостерігається у пізній експоненційній фазі росту; тривалість процесу культивування становить 24—30 год [279].

Показано, що швидкість утворення ЕПС метилотрофним штамом *Methylomonas methanolica* M13V є максимальною в кінці експоненційної фази росту і поступово знижується у фазі сповільненого росту [107]. Проте кількість синтезованих ЕПС та їх вихід зростають після припинення росту.

Утворення ЕПС у *Methylocystis parvus* OBVP починалось і закінчувалось майже у той самий час, що й ріст культури. Проте в'язкість культуральної рідини суттєво підвищувалась у стаціонарній фазі росту (від 160 до 900 мПа · с) [112].

У облігатних метаноокиснювальних бактерій *Methylococcus* sp. і *M. thermophilus* максимальна швидкість синтезу ЕПС спостерігається у фазі сповільненого росту, концентрація ЕПС у культуральній рідині досягає максимуму в стаціонарній фазі [7, 8]. Показано, що умови культивування, а також спосіб одержання інокуляту дають змогу зсунути час досягнення максимальної швидкості утворення ЕПС у більш ранню ростову фазу, що уможливорює скорочення тривалості культивування продуцента [7].

В умовах періодичного культивування *Pseudomonas mendocina* синтез альгінату починається в експоненційній фазі росту, однак основна кількість полімеру (понад 75 %) синтезується після вичерпання в середовищі джерела азоту [223]. Аналогічні закономірності синтезу альгінату встановлено для іншого продуцента цього ЕПС — *Azotobacter vinelandii* [111]. Водночас для *Pseudomonas aeruginosa* максимальний вихід альгінату спостерігається в експоненційній фазі росту [171].

Під час вивчення хемостатного культивування *Pseudomonas aeruginosa* (в умовах лімітування азотом) встановлено, що синтез альгінату не залежить від швидкості розбавлення середовища в межах значень $D = 0,05\text{—}0,1 \text{ год}^{-1}$ [171]. Питома швидкість утворення ЕПС зростала за підвищення швидкості розбавлення. Проте у разі тривалого культивування в таких умовах штам з великою частотою дисоціював і утворював немуккоїдні варіанти. Williams зі співавт. [267] зазначають, що поява немуккоїдних варіантів *P. aeruginosa* спостерігається також у процесі вирощування бактерій на N-лімітованому середовищі за низьких швидкостей розбавлення ($0,05 \text{ год}^{-1}$). Досліди з хемостатною культурою *P. mendocina* показали, що оптимальна швидкість розбавлення середовища для синтезу альгінату становить $0,05 \text{ год}^{-1}$ [223]. У цьому разі за лімітування азотом вихід альгінату становив 64 %, тоді як за лімітування вуглецем — лише 23,7 %. *Azotobacter vinelandii* характеризується високим рівнем синтезу альгінату за значень $D = 0,05\text{—}0,25 \text{ год}^{-1}$, швидкість синтезу ЕПС у вказаних межах значень D практично стала, вихід альгінату з сахарози варіює залежно від лімітувального джерела живлення [122, 123].

Максимальний синтез ЕПС *Agrobacterium radiobacter* NC1B за безперервного культивування в умовах лімітування азотом спостерігається за низьких швидкостей розбавлення ($0,04\text{—}0,08 \text{ год}^{-1}$) [152]. Найвищий вихід курдлану у безперервному про-

цесі за лімітування азотом одержали за швидкості розбавлення середовища менше $0,1 \text{ год}^{-1}$ [193]. Для *Xanthomonas campestris* також показано, що швидкість утворення ксантану є функцією ступеня розбавлення середовища [5, 231, 243]. Аналогічні закономірності встановлено для C_1 -окиснювальних [106, 238], а також для молочнокислих бактерій [67, 154, 214].

Дослідження синтезу ЕПС в умовах безперервного культивування *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M в інтервалі швидкості розбавлення від $0,3$ до $0,8 \text{ год}^{-1}$ показало, що максимальний синтез полісахаридів спостерігається за низьких значень D ($0,3 \text{ год}^{-1}$) [67].

1.2. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) 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 [74, 205, 207, 233]. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [87].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні дотепер не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі, є великі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [60, 87].

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі: використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості); оптимізація умов культивування продуцента та пошук нових рентабельних методів виділення й очищення ПАР; одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

На сьогодні дослідниками активно реалізуються перші два підходи, у той час як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР до недавнього часу не розглядалося як ефективний інструмент зниження собівартості виробництва мікробних ПАР.

1.2.1. Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20—30 % загальних витрат на виробництво [157]. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (масложирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини) [157, 200, 227].

У ряді праць [191, 253, 258] показано, що жири рослинного походження можуть використовуватися як ефективна та дешева сировина для синтезу ПАР. Так, соняшникова, соєва, рапсова, кукурудзяна олії можуть слугувати субстратами для синтезу рамноліпідів, софороліпідів, манозоліпідів (табл. 1.2) [95, 131, 197]. Проте ці сполуки є харчовою сировиною, що обмежує їх застосування у біотехнологічних процесах. З дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, касторова олія та олія жожоба [131]. Крім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Показано можливість використання відходів виробництва соєвої та соняшникової олії для синтезу рамноліпідів штамами *Pseudomonas aeruginosa* AT10 і *P. aeruginosa* LB1 [52, 65, 66, 178]. За наявності у середовищі культивування *Candida antarctica* та *C. apicola* відходів виробництва соняшникової олії кількість синтезованих гліколіпідів становила 10,5 та 13,4 г/л відповідно [62]. Промислові жировмісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також слугувати потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати є доступними у необхідних кількостях і дешевими, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази.

У літературі є повідомлення про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема сироватки [90, 91]. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі з сирною сироваткою кількість синтезованих рамноліпідів становить 0,92 г/л, що перевищує показники синтезу ПАР на синтетичних середовищах. Використання сироватки як

Таблиця 1.2

Використання рослинних жирів для промислового отримання ПАР

Субстрат	ПАР	Штам-продуцент	Синтезовані ПАР, г/л
Рапсова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas species</i> DSM 2874	45
Кукурудзяна олія	Софороліпіди	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	40
Соняшникова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31
Соева олія	Ліпопептиди	<i>Serratia marcescens</i>	Немає даних
	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	2,98
	Манозилерит-ритолліпіди	<i>Candida species</i> SY16	9,5

субстрату може вирішити проблему утилізації цього відходу молочної промисловості та суттєво зменшити витрати на виробництво ПАР.

Як альтернативну сировину для виробництва ПАР також застосовують крохмалевмісні відходи. Так, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, які містять відходи картоплепереробних виробництв [182, 183, 250, 251]. Побічний продукт виробництва борошна з маніюки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 і *B. subtilis* LB5a [179—181]. За використання такого субстрату кількість ліпопептидів досягає 2,2—3,0 г/л. Субстратами для виробництва ПАР можуть слугувати такі крохмалевмісні речовини як рідкі відходи переробки рису, обробки злаків, патоки, кукурудзяного борошна.

Наші дослідження показали можливість використання для синтезу ПАР гідрофільних субстратів (етанолу, гліцерину), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони є водорозчинними і тому технологічнішими, по-друге, ці субстрати значно дешевші.

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccini* K-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [37], і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах [35, 36, 38].

Слід зазначити, що бактерії родів *Rhodococcus* і *Acinetobacter* ростуть на етанолі [76, 77, 209], проте до теперішнього часу немає даних про синтез ними ПАР на цьому субстраті. Відомості про утворення ПАР представниками роду *Nocardia* навіть на гідрофобних субстратах є дуже обмеженими [132, 156].

Згідно з результатами наших досліджень, штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 під час росту на етанолі синтезує ПАР у незначних кількостях [35]. Поверхневий натяг культуральної рідини (σ) становив 50–55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР*) досягала 1,1–1,2, а концентрація ПАР — 0,4–0,43 г/л, тоді як під час росту культури на гідрофобних субстратах ці показники були значно вищими. Подальші експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту на нітратне у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1, підвищення концентрації етанолу до 2 %, підтримання співвідношення вуглець/азот на рівні 36 : 1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР у 3 рази.

Максимальний синтез ПАР у процесі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на етанолі (умовна концентрація ПАР 3,6; індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини 96 %) спостерігався за наявності у середовищі сечовини як джерела азоту, а також дріжджового автолізу та мікроелементів у співвідношенні С/Н 60 : 1 і використанні інокуляту з кінця експоненційної фази росту у концентрації 10 % [38].

Натепер одним із найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин — побічний продукт, що утворюється у великих кількостях при виробництві біодизелю з рослинної і тваринної сировини [270]. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансестерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [270]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на сьогодні найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі. Одним із шляхів утилізації гліцерину може бути використання його як джерела вуглецю та енергії при розробці технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

Наші експерименти показали можливість синтезу ПАР у процесі вирощування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5 % гліцерину, за яких показники синтезу ПАР підвищувалися

у кілька разів. Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2—5,0 за наявності у середовищі іонів заліза і дріжджового автолізу, використання інокуляту, вирощеного на гліцерині до середини експоненційної фази росту, тривалості культивування 168 год.

1.2.2. Ефективні й економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших факторів, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять приблизно 60 % загальних витрат на виробництво. Для виділення ПАР у промисловості використовують ряд традиційних методів, зокрема кислотне осадження, екстракцію органічними розчинниками, кристалізацію, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо [87]. Упродовж останніх років було розроблено кілька нових методів для виділення позаклітинних ПАР: ультрафільтрація, сорбція на полістирольних матрицях та активованому вугіллі, іонообмінна хроматографія (табл. 1.3) [92, 203, 222]. Основною перевагою цих методів є можливість організації безперервного технологічного процесу та одержання високоочищених ПАР.

Слід зазначити, що у хроматографічних методах для здійснення процесів десорбції використовують високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). В останні роки у промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метил-третбутилового ефіру. Зокрема, така технологія застосовується для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus* [142, 194]. Ці розчинники є дешевими і менш токсичними, що дає змогу суттєво зменшити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР та мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Зазначені переваги запропонованих розчинників дають можливість створення на їх основі конкурентоспроможніших технологій.

У ряді випадків використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому на теперішній час широко застосовують багатоступеневі схеми, що включають кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від супутніх домішок [203]. Така схема дає змогу одержува-

Таблиця 1.3

Вибір методу виділення ПАР залежно від їх фізико-хімічних властивостей

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратурне забезпечення	Переваги методу	Літературне джерело
Кислотне осадження	Здатність ПАР переходити у малорозчинну форму за низьких значень рН	Збірник	Низька вартість, висока ефективність виділення	[219—221]
Осадження сульфатом амонію	Здатність ПАР білкової природи за певних значень іонної сили розчину (ізоелектрична точка) переходити у малорозчинну форму	Збірник	Ефективність під час виділення деяких груп полімерних ПАР	[225]
Екстракція органічними розчинниками	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їх молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Ефективний метод для виділення та часткового очищення ПАР, можливість регенерації розчинника	[92, 203]
Екстракція метилтретбутиловим ефіром	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їх молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Використання низькотоксичного розчинника, можливість регенерації екстрагента, низька вартість	[142, 194]
Флотация	Здатність ПАР за рахунок поверхнево-активних властивостей формувати і переходити в піну	Спеціально сконструйовані реактори	Можливість організації безперервного процесу виділення ПАР, високий ступінь очищення ПАР	[85, 183]
Ультрафільтрація	Здатність ПАР формувати міцели, що затримуються полімерними мембранами	Ультрафільтраційний модуль, що містить полімерні пористі мембрани	Можливість проведення швидкої регенерації мембран, високий рівень чистоти отриманих препаратів	[198, 222]

Закінчення табл. 1.3

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратурне забезпечення	Переваги методу	Літературне джерело
Адсорбція на полістирольних матрицях	Здатність до адсорбції ПАР на полімерних носіях з наступною десорбцією органічними розчинниками	Колонки, заповнені полістирольним носієм	Можливість проведення швидкої регенерації носія, високий рівень чистоти отриманих препаратів	[203]
Адсорбція на активованому вугіллі	Здатність ПАР адсорбуватися на активованому вугіллі та десорбуватися органічними розчинниками	Колонки, заповнені сорбційним матеріалом, або безпосереднє внесення вугілля в культуральну рідину	Можливість отримання високоочищених препаратів, швидка регенерація сорбенту, низька вартість	[92]
Іонообмінна хроматографія	Полярність молекули ПАР, що зумовлює здатність до обміну його зарядженої частини на рухомі іони катіонів та аніонів	Колонки, заповнені іонообмінною смолою	Можливість отримання високоочищених препаратів, багаторазове використання носія, швидкий процес регенерації	[203]

ти поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти. Наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, характеризуються низькою вартістю і можуть використовуватись у нафтодобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Натомість високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів. Така багатоступенева технологія має впроваджуватися на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектра галузей промисловості.

1.2.3. Мутантні і рекомбінантні штами — надсинтетики поверхнево-активних речовин

Окрім оптимізації складу живильного середовища та умов культивування, вибору ефективного методу виділення цільового метаболіту, комерційна складова будь-якого біотехнологічного процесу залежить від потенційних можливостей штаму-продуцента. У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів, здатних до максимально повної трансформації субстратів у ПАР. Використання таких «модифікованих» продуцентів дасть змогу підвищити ефективність технологічного процесу та одержувати ПАР із заданими властивостями. Для одержання надпродуцентів ПАР використовують транспозони [134], іонізувальне випромінювання [245], хімічні мутагени типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин [150] або процеси селекції на основі резистентності до іонних детергентів [225] тощо (табл. 1.4.)

Упродовж останніх років було одержано ряд високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, з використанням як вектора плазмиди pC112 введенням гена *lpa-14*, відповідального за синтез сурфактину [186], сконструйовано штам *Bacillus subtilis* MI 113. На середовищах із соєвим борошном рекомбінантний штам синтезував у 8 разів більше сурфактину, ніж вихідний. Створено ряд рекомбінантних штамів *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* — надсинтетиків рамноліпідів [185].

Застосування генно-інженерних методів дає змогу не тільки підвищити продуктивність штамів, а й змінити хімічний склад синтезованих ними ПАР. Так, зміна нуклеотидної послідовності гена, що кодує синтез сурфактину, супроводжувалась зміною складу ферментного комплексу і, як наслідок, синтезом нового ПАР (ліхенізин) штамом *Bacillus subtilis* [269].

Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* (продуцент рамноліпідів) не здатний використовувати для росту і біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гена *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штами, які синтезували рамноліпіди на середовищі з молочною сироваткою [135].

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штам *Gordonia amarae* введенням стійкого гена гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу у 4 рази збільшити синтез трегалозоліпідів [89].

Таблиця 1.4

Ефективність використання для синтезу ПАР мутантних штамів

Мутантний штам	Спосіб одержання	Збільшення синтезу ПАР, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59C7	Введення транспозону Tn5-GM у <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC 1637	Обробка N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном	900
<i>Bacillus licheniformis</i> KGL11	Те саме	1100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 55033	» »	300—500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EBN-8	Дія γ -випромінювання на <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	100—200
<i>Bacillus subtilis</i> Suf-1	Дія ультрафіолету на <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	200—300
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Селекція на основі резистентності до катіонних детергентів	100—200

1.2.4. Фізіологічні основи регуляції синтезу поверхнево-активних речовин

Ще одним підходом до підвищення ефективності технологій одержання продуктів мікробного синтезу є внесення екзогенних попередників у середовище культивування продуцента. Так, раніше нами було показано можливість інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану додаванням у середовище C_4 -дикарбонових кислот — інтермедіатів метаболізму етанолу, які є попередниками глюконеогенезу [18]. З літератури відомо, що за наявності попередників збільшується синтез макролідних антибіотиків [20, 23]. У 80—90-х роках ХХ ст. дослідниками було встановлено стимулюючий вплив цитрату натрію на утворення ПАР мікроорганізмами [16, 212, 241]. Такий ефект пояснюють активуючим впливом цитрату на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, в свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, й ПАР ліпідної природи [137].

Наші дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу ПАР штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за наявності у се-

редовищі з етанолом цитрату (регулятора синтезу ліпідів) і фумарату (попередника глюконеогенезу).

Встановлено, що збільшення на 40—100 % показників синтезу ПАР за умови внесення цитрату (0,1 %) і фумарату (0,2 %) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлене активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення у 1,4—1,5 і 3,4—3,6 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази відповідно, а також зниження у 1,5—1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази.

Слід зазначити, що відомі на теперішній час дані показують можливість інтенсифікації синтезу ПАР за наявності цитрату [4, 16, 137, 212, 241], проте встановлені нами закономірності відрізняються від описаних у літературі. Так, згідно з літературними даними, цитрат вносили у концентрації 0,5—1,0 % на початку процесу культивування продуцентів ПАР. За такої концентрації цитрат можна розглядати як додатковий ростовий субстрат, а не регулятор синтезу ліпідів. На сьогодні практично відсутні відомості про вплив C_4 -дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу на синтез ПАР. Відомо, що внесення солей органічних кислот циклу Кребса (сукцинату і фумарату у концентрації 0,5 %) у середовище культивування *Bacillus subtilis* C-14 на початку процесу культивування супроводжувалось збільшенням кількості синтезованих ПАР у 1,5—2 рази [45]. При цьому спостерігали також підвищення рівня біомаси, зростання індексу емульгування і показника умовної концентрації ПАР.

Зазначимо, що нам не вдалося знайти даних про збільшення синтезу ПАР за одночасної наявності у середовищі культивування як цитрату (регулятора синтезу ліпідів), так і C_4 -дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу). Крім того, залишаються практично не дослідженими механізми, що забезпечують інтенсифікацію утворення ПАР у відповідь на наявність у середовищі попередників їх синтезу. Так, у праці [212] встановлено, що за наявності цитрату знижується активність ізоцитратдегідрогенази у клітинах *Bacillus subtilis*, тобто збільшення синтезу сурфактину автори пояснюють переважними витратами вуглецю субстрату на процеси біосинтезу ПАР. Водночас для дріжджів *Torulopsis apicola* — продуцента поверхнево-активних гліколіпідів — встановлено, що механізм дії ци-

трату натрію полягає у підтриманні рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлучення культуральної рідини в результаті транспорту цитрату шляхом симпорту з протоном, що й забезпечує збільшення синтезу ПАР [241]. Аналогічно на синтез ПАР *T. apicola* діяли солі й інших органічних кислот (сукцинату, тартрату і малонату).

1.3. Вплив зовнішніх факторів на синтез мікробних поверхнево-активних речовин

1.3.1. Вплив умов культивування на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекани

Характеристика *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. *R. erythropolis* ЕК-1 ізолювано із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам *R. erythropolis* ЕК-1 депоновано в Депозитарії мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного) за номером ІМВ Ас-5017.

Морфолого-культуральні ознаки. На 24 год росту на м'ясопептонному агарі (МПА) клітини мають вигляд нерухомих довгих паличок (3—8 мкм), рідко трапляються палички завдовжки 2—3 мкм. Палички рівні та зігнуті. Іноді трапляються ланцюжки, що складаються з 3—6 коків. Ланцюжки складаються переважно з 2—5 паличок.

На 24 год росту на сусло-агарі (СА) клітини мають вигляд нерухомих коротких паличок (2—3 мкм), більшість з яких з'єднані попарно, та коків, які утворюють рівні й зігнуті ланцюжки.

На 24 год росту на глюкозо-картопляному агарі (ГКА) клітини мають вигляд нерухомих коротких паличок завдовжки 2—3 мкм, рідко трапляються довгі (5—7 мкм). Палички рівні та зігнуті. Кокові форми не виявлено.

Під час росту на агаризованих середовищах *R. erythropolis* ЕК-1 на 24 год утворює складчасті (шорсткуваті) колонії блідо-кремового (МПА) або блідо-оранжевого забарвлення (СА та ГКА).

У процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому мінеральному живильному середовищі з гідрофільними субстратами (етанолом, глюкозою) утворюється однорідна гомогенна суспензія клітин. На гідрофобних субстратах (гексадекан) залежно від умов культивування (масообмін, тривалість культивування, склад живильного середовища) може спостерігатись агрегація клітин у формі кульок різної форми та кольору (від кремового і

рожевого до оранжевого), які перебувають на поверхні середовища. Залежно від умов культивування забарвлення культуральної рідини змінюється від молочно-білого до темно-коричневого кольору.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Як джерело вуглецю та енергії штам використовує глюкозу, сахарозу, фруктозу, маніт, оцтовий кислотний натрій, етанол, гексадекан, рідкі парафіни, керосин, а також здатний засвоювати нафту, цитрат натрію, бензин. Як джерело азоту штам використовує амонійний та нітратний азот. Не потребує факторів росту. Строгий аероб. Росте в діапазоні температур 10—34 °C і рН 6,0—8,5. Оптимум для росту — 30 °C. Крохмаль не гідролізує, желатину не розріджує, сірководень не утворює, росте на середовищі з 3—5 % хлористого натрію.

У попередніх дослідженнях [35] встановлено, що найнижчі значення поверхневого натягу (σ_s — 30—39 мН/м) і найвищі показники синтезу ПАР спостерігаються під час росту *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофобних субстратах. Наступні експерименти були присвячені вивченню закономірностей синтезу ПАР на гексадекані.

R. erythropolis ЕК-1 вирощували на середовищах такого складу (г/л): середовище 1 — KH_2PO_4 — 6,8; NaOH — 1,0; NH_4NO_3 — 0,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; рН 6,8—7,0; середовище 2 — KNO_3 — 1,0; NaCl — 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; рН 6,8—7,0.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

- поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, який вимірювали за допомогою платинової і скляної пластинки за методом Вільгельмі [1];
- для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини (супернатанта) до точки ККМ (критичної концентрації міцелоутворення). Будували графік залежності поверхневого натягу σ_s від значення логарифму розведення супернатанту. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*, яка виражається у безрозмірних одиницях;
- емульгувальні властивості (індекс емульгування) досліджуваних зразків визначали за методом, описаним у статті [35]. Як субстрати для емульгування використовували вазелінове масло,

Вплив концентрації гексадекану і тривалості культивування на синтез ПАР

Середовище	Концентрація гексадекану, %	Тривалість культивування, год	Показник		
			pH _{кін}	ПАР*	ПАР, г/л
1	1,0	120	5,7	1,3 ± 0,04	Не визначали
		168	5,7	1,7 ± 0,06	0,95 ± 0,03
	2,0	120	5,8	1,5 ± 0,05	Не визначали
		168	5,6	2,2 ± 0,065	2,6 ± 0,11
	3,0	120	5,7	1,6 ± 0,058	Не визначали
		168	5,6	2,3 ± 0,07	2,7 ± 0,12
2	1,0	120	6,7	1,6 ± 0,05	1,0 ± 0,035
		168	6,7	2,4 ± 0,08	1,75 ± 0,07
	2,0	120	6,6	3,8 ± 0,15	3,0 ± 0,11
		168	6,7	4,3 ± 0,15	5,0 ± 0,17
	3,0	120	6,3	3,8 ± 0,15	Не визначали
		168	6,5	4,4 ± 0,17	5,5 ± 0,21

Примітка. Посівний матеріал вирощували на ГКА; $K_s = 0,11$ г O_2 /л · год; суб-

соняшникової, рапсової та соєвої олій, керосин, рідкі парафіни, легку нафту (густина 0,80 г/см³).

Кількість синтезованих ПАР (вміст загальних ліпідів у культуральній рідині) визначали ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча (хлороформ : метанол — 2 : 1) з наступним випарюванням розчинника під вакуумом (40 °C).

Залежність синтезу ПАР від концентрації гексадекану і тривалості культивування. Досліджували здатність бактерій *R. erythropolis* ЕК-1 синтезувати ПАР при внесенні різних концентрацій гексадекану у живильні середовища 1 і 2 упродовж 120 та 168 год. Результати експериментів наведено в табл. 1.5.

Найвищі показники синтезу ПАР спостерігали у процесі вирощування бактерій на середовищах з 2 % гексадекану упродовж 168 год. Слід зазначити, що максимальна кількість ПАР накопичувалась при внесенні у середовище 3 % гексадекану, однак при цьому знижувався вихід ПАР щодо заданого субстрату.

Вплив природи джерела азотного живлення і співвідношення C/N на утворення ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі 2 показники синтезу ПАР були вищими, ніж на середовищі 1, що можна пояснити зниженням рН на середовищі 1 до неоптимального для накопичення ПАР значення (табл. 1.5).

Таблиця 1.5

R. erythropolis ЕК-1

синтезу ПАР			
Вихід ПАР від заданого субстрату, %	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
	Без розведення	1 : 9	1 : 49
Не визначали	74 ± 2,1	Не визначали	Не визначали
15,8 ± 0,52	53 ± 2,4	47 ± 2,5	42 ± 2,2
Не визначали	58 ± 2,6	55 ± 2,2	54 ± 2,2
21,7 ± 0,74	56 ± 2,5	53 ± 2,0	47 ± 2,3
Не визначали	60 ± 2,4	58 ± 2,0	56 ± 2,2
15,0 ± 0,55	60 ± 2,3	53 ± 2,1	53 ± 2,2
16,7 ± 0,63	90 ± 2,2	63 ± 1,9	60 ± 2,5
29,2 ± 0,98	80 ± 2,5	71 ± 2,0	65 ± 2,3
25,0 ± 0,94	60 ± 2,1	60 ± 2,2	60 ± 2,8
41,7 ± 1,52	71 ± 2,3	66 ± 2,1	62 ± 2,9
Не визначали	56 ± 2,1	Не визначали	Не визначали
29,4 ± 1,05	53 ± 2,8	52 ± 2,1	50 ± 2,2

страт для емульгування — вазелінове масло.

Для стабілізації рН на рівні нейтрального нітрат амонію у середовищі 1 було замінено на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату калію (табл. 1.6).

Таблиця 1.6

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від природи джерела азотного живлення

Концентрація гексадекану, %	Джерело азоту	pH _{кін}	ПАР*	ПАР, г/л	Вихід ПАР від заданого субстрату, %	Індекс емульгування культуральної рідини, %
1,0	NH ₄ NO ₃	5,7	1,7 ± 0,05	0,95 ± 0,033	15,8 ± 1,8	53 ± 2,2
	KNO ₃	7,2	2,9 ± 0,1	1,8 ± 0,07	30,0 ± 2,2	48 ± 2,1
2,0	NH ₄ NO ₃	5,6	2,2 ± 0,05	2,6 ± 0,1	21,7 ± 2,8	56 ± 2,7
	KNO ₃	7,4	3,4 ± 0,1	3,8 ± 0,13	31,7 ± 3,1	58 ± 2,8
3,0	NH ₄ NO ₃	5,6	2,3 ± 0,08	2,7 ± 0,09	15,0 ± 2,4	60 ± 2,2
	KNO ₃	7,35	3,5 ± 0,1	3,9 ± 0,15	21,7 ± 2,7	56 ± 2,4

Примітка. Культивування продуцента здійснювали на середовищі 1 упродовж 168 год; посівний матеріал з ГКА, $K_s = 0,11$ г O₂/л · год; субстрат для емульгування — вазелінове масло; концентрація нітрату калію (1,5 г/л) еквімолярна за азотом 0,6 г/л нітрату амонію.

Таблиця 1.7

Утворення ПАР залежно від співвідношення вуглець/азот в середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1

Вміст KNO ₃ , г/л	Співвід- ношення C/N	ПАР*	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
			Без розведення	1 : 9	1 : 49
0,5	146 : 1	1,3 ± 0,03	65,1 ± 2,7	54,4 ± 2,5	56,4 ± 2,5
1,0	73 : 1	4,3 ± 0,14	47,8 ± 3,0	51,4 ± 2,5	51,6 ± 2,6
1,5	48,7 : 1	4,6 ± 0,16	54,4 ± 2,5	61,2 ± 2,6	63,6 ± 2,0
2,0	36,5 : 1	4,4 ± 0,15	51,5 ± 2,5	59,9 ± 3,0	58,0 ± 2,7

П р и м і т к а. Культивування здійснювали на середовищі 2 з 2 % (об'ємна частка) гексадекану упродовж 168 год; субстрат для емульгування — соняшникова олія; посівний матеріал вирощували на ГКА; $K_s = 0,11$ г O₂/л · год.

Згідно з даними, наведеними у табл. 1.6, у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі 1 з KNO₃ умовна концентрація ПАР підвищувалась з 1,7—2,3 до 2,9—3,5, а вміст загальних ліпідів — у 1,5—1,7 рази порівняно з використанням як джерела азоту нітрату амонію.

Оскільки показники синтезу ПАР на середовищі 2 були вищими, ніж на середовищі 1 (див. табл. 1.5), у подальших дослідженнях для вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 використовували середовище 2. Слід зазначити також, що це середовище простіше і економічніше за складом: загальний вміст солей у ньому в три рази нижчий за такий у середовищі 1.

Дослідження показали, що оптимальним для синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 є співвідношення C/N, що становить 49 : 1 (табл. 1.7).

Синтез ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за різних умов масообміну. Першою реакцією катаболізму вуглеводнів є їх окиснення до відповідних спиртів за участю кисню під дією ферментів монооксигеназ. У зв'язку з цим рівень аерації (масообміну) є важливим фактором, що може впливати на утворення ПАР під час росту *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані. Дані про синтез ПАР штамом *R. erythropolis* ЕК-1 за різних умов масообміну наведено у табл. 1.8. Експерименти показали, що для максимального накопичення ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 сульфітне число має бути не нижче за 0,11 г O₂/л · год.

Залежність синтезу ПАР від температури. При дослідженні впливу температури (в інтервалі 30 ÷ 20 °С) на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1, встановлено, що у разі зниження температури до

Таблиця 1.8

Вплив масообміну на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1

K_s , г O_2 /л · год	Концентрація гексадекану, %	ПАР*	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
			Без розведення	1 : 9	1 : 49
0,04	1,0	$1,3 \pm 0,04$	$55,5 \pm 1,9$	$42,6 \pm 2,2$	$33,3 \pm 2,7$
	2,0	$1,6 \pm 0,06$	$50,9 \pm 2,4$	$40,3 \pm 2,0$	$39,4 \pm 2,5$
0,11	1,0	$2,4 \pm 0,07$	$30,3 \pm 2,6$	$36,8 \pm 2,0$	$40,8 \pm 2,5$
	2,0	$4,3 \pm 0,13$	$47,8 \pm 2,5$	$51,4 \pm 2,0$	$51,6 \pm 2,5$
0,14	1,0	$2,6 \pm 0,8$	$32,0 \pm 2,2$	$35,8 \pm 2,4$	$41,8 \pm 2,0$
	2,0	$4,3 \pm 0,13$	$37,9 \pm 2,2$	$56,8 \pm 1,9$	$56,4 \pm 2,0$

П р и м і т к а. Культивування здійснювали на середовищі 2, яке містило 1,0 г/л KNO_3 , упродовж 168 год; субстрат для емульгування — соняшникова олія; посівний матеріал вирощували на ГКА.

25 і 20 °С рівень накопичення ПАР підвищувався, але при цьому знижувався рівень біомаси. Максимальні показники синтезу ПАР спостерігалися при 20 °С (табл. 1.9).

Вплив способу підготовки посівного матеріалу та субстрату на синтез ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Одним із факторів, що істотно впливає на синтез ПАР, є спосіб підготовки посівного матеріалу. Згідно з даними статті [36], при використанні інокуляту, вирощеного на рідкому мінеральному середовищі, показники росту бактерій і синтезу ПАР зменшувалися порівняно з використанням інокуляту з ГКА.

Таблиця 1.9

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від температури культивування

Температура, °С	ПАР*	Біомаса, г/л	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
			Без розведення	1 : 9	1 : 49
20	$2,8 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,04$	$50,2 \pm 2,2$	$47,6 \pm 2,2$	$48,9 \pm 2,1$
25	$2,1 \pm 0,07$	$1,15 \pm 0,05$	$55,3 \pm 2,0$	$43,4 \pm 2,0$	$47,9 \pm 1,9$
30	$1,3 \pm 0,04$	$1,35 \pm 0,05$	$55,5 \pm 2,1$	$42,6 \pm 2,0$	$33,3 \pm 2,7$

П р и м і т к а. Культивування здійснювали на середовищі 2, яке містило 1,0 % (об'ємна частка) гексадекану, 1,0 г/л KNO_3 , упродовж 168 год; субстрат для емульгування — соняшникова олія; посівний матеріал вирощували на ГКА; $K_s = 0,04$ г O_2 /л · год.

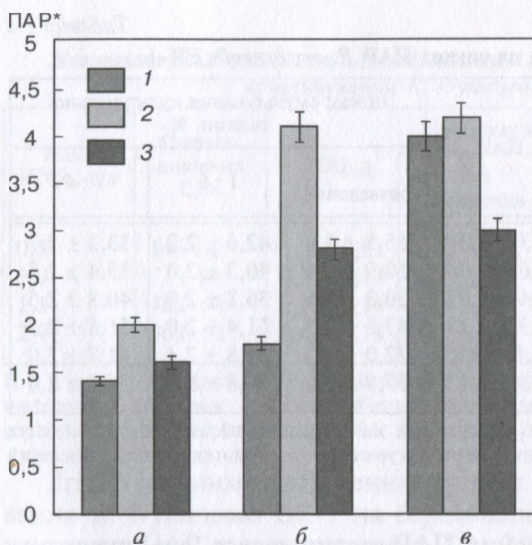


Рис. 1.1. Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від фізіологічного стану інокуляту:

а — тривалість культивування 96 год; б — 168 год; в — 240 год; 1 — початок експоненційної фази росту інокуляту; 2 — середина експоненційної фази; 3 — початок стаціонарної фази росту.

Концентрація гексадекану у середовищі 2 при отриманні інокуляту — 0,3 %; концентрація посівного матеріалу — 5 %. $K_s = 0,14 \text{ г O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$

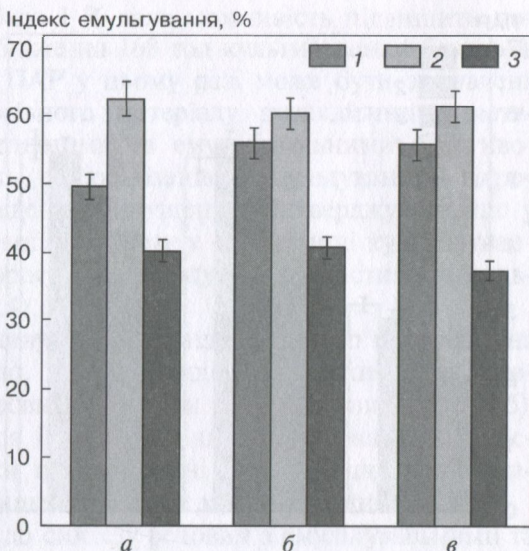
З літературних джерел відомо, що у багатьох мікроорганізмів (представників родів *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*) окиснення вуглеводнів відбувається під дією трикомпонентного алкангідроксилазного ферментного комплексу, який складається з мембранозв'язаної алканмонооксигенази та двох розчинних білків — рубредоксину (залізосіркопротеїд) і рубредоксинредуктази [143]. Синтез алкангідроксилази у *Pseudomonas oleovorans* залежить від наявності достатньої кількості іонів заліза у середовищі культивування. Результати наших експериментів показали [36], що внесення в середовище культивування іонів заліза супроводжувалося різким збільшенням біомаси бактерій і синтезу ПАР. У зв'язку з цим у подальших дослідженнях *R. erythropolis* ЕК-1 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; рН 6,8—7,0.

Відомо, що рівень накопичення ПАР і тривалість процесу біосинтезу залежать від фізіологічного стану і концентрації інокуляту [87, 208]. Використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту дало змогу істотно активізувати синтез ПАР, що підтверджувалося високими показниками їх умовної концентрації (4,1) вже на 168 год культивування (рис. 1.1). Аналогічні показники при використанні інокуляту з ранньої експоненційної фази росту спостерігалися лише на 240 год культивування *R. ery-*

Рис. 1.2. Вплив фізіологічного стану інокуляту на синтез *R. erythropolis* ЕК-1 метаболітів з емульгувальними властивостями:

a — тривалість культивування 96 год; *б* — 168 год; *в* — 240 год; 1 — початок експоненційної фази росту інокуляту; 2 — середина експоненційної фази; 3 — початок стаціонарної фази росту.

Концентрація гексадекану у середовищі 2 при отриманні інокуляту — 0,3 %; концентрація посівного матеріалу — 5 %. Індекс емульгування наведено для нативної культуральної рідини. Субстрат для емульгування — соняшникова олія. $K_s = 0,14 \text{ г О}_2/\text{л} \cdot \text{год}$



thropolis ЕК-1. При внесенні інокуляту з ранньої стаціонарної фази росту значення ПАР* не перевищували 3,0 (рис. 1.1).

Найвищі емульгувальні властивості були притаманні культуральній рідині, одержаній з використанням інокуляту з ранньої експоненційної та середини експоненційної фаз росту (рис. 1.2). Так, показник індексу емульгування розведеної у 50 разів культуральної рідини залишався на рівні 50—60 % упродовж всього процесу культивування.

Максимальний індекс емульгування культуральної рідини, отриманої при використанні посівного матеріалу з ранньої стаціонарної фази росту, спостерігався на 168 год і становив лише 40,6 % (рис. 1.2).

З урахуванням того, 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 на рис. 1.1 та 1.2, що засвідчує залежність синтезу ПАР саме від фізіологічного стану посівного матеріалу, а не від кількості клітин у ньому.

Встановлено, що оптимальна концентрація гексадекану для вирощування інокуляту становить 1 % (рис. 1.3). За такої кон-

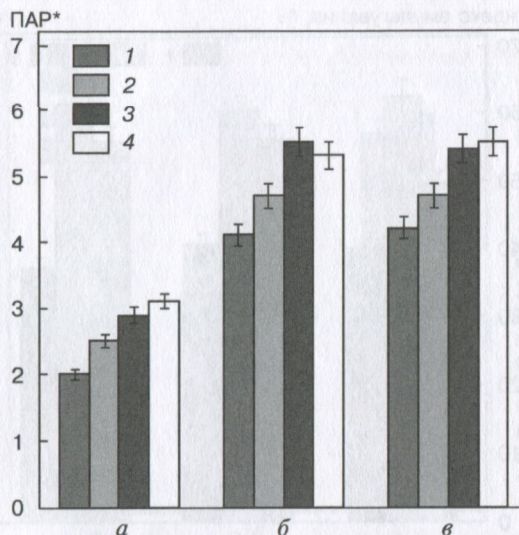


Рис. 1.3. Вплив концентрації гексадекану у середовищі під час одержання інокуляту на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1:

a — тривалість культивування 72 год; *б* — 168 год; *в* — 240 год; 1 — 0,3 % гексадекану; 2 — 0,7; 3 — 1,0; 4 — 1,3 %.

Культивування здійснювали на середовищі 2. Посівний матеріал (5 %) з середини експоненційної фази росту.

$K_s = 0,14 \text{ г O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$

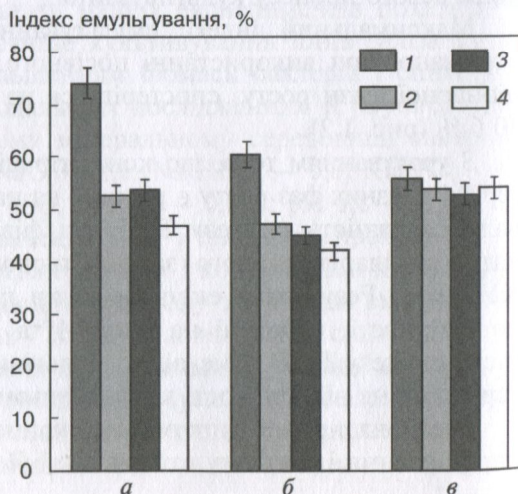
центрації субстрату одержували посівний матеріал у вигляді гомогенної клітинної суспензії, що дає змогу суттєво спростити технологію засіву лабораторного ферментатора та виключити негативний вплив процесів агрегації на клітини продуцента.

Наведений спосіб приготування посівного матеріалу дав змогу інтенсифікувати синтез ПАР (рис. 1.3). Так, збільшення об'ємної

Рис. 1.4. Вплив концентрації субстрату у середовищі під час одержання посівного матеріалу на емульгувальні властивості культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1:

a — тривалість культивування 72 год; *б* — 168 год; *в* — 240 год; 1 — 0,3 % гексадекану; 2 — 0,7; 3 — 1,0; 4 — 1,3 %.

Посівний матеріал (5 %) з середини експоненційної фази росту. $K_s = 0,14 \text{ г O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$. Індекс емульгування наведено для нативної культуральної рідини. Субстрат для емульгування — соняшникова олія



частки гексадекану з 0,3 до 1 % дало можливість підвищити показник ПАР* з 4,1 до 5,5 вже на 168 год культивування бактерій. Інтенсифікація синтезу ПАР у цьому разі може бути зумовлена наявністю у складі посівного матеріалу позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями, що забезпечують солюбілізацію (емульгування) гідрофобного субстрату. Наведене припущення підтверджує те, що у разі зниження концентрації субстрату у середовищі культивування інокуляту до 0,3 % зростали емульгувальні властивості культуральної рідини (рис. 1.4).

При дослідженні впливу концентрації посівного матеріалу на синтез ПАР встановлено, що найвищі показники ПАР* спостерігались, якщо у середовище вносили 10 % інокуляту (рис. 1.5). Так, умовна концентрація ПАР становила 3,8 вже на 96 год росту. Аналогічні показники при внесенні 5 і 15 % посівного матеріалу спостерігалися лише на 168 год культивування.

Відомо, що здатність до синтезу речовин з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями відіграє провідну роль у процесах росту ПАР-синтезуючих мікроорганізмів на гідрофобних субстратах [207]. Так, при культивуванні бактерій роду *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* на *n*-алканах синтез емульгатора забезпечує створення мікроемульсії субстрату навколо клітин продуцента, що приводить до збільшення площі контакту клітини

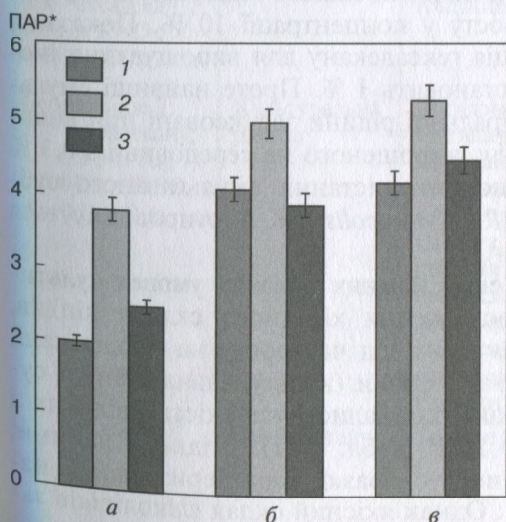


Рис. 1.5. Вплив концентрації посівного матеріалу на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1:

а — тривалість культивування 96 год; б — 168 год; в — 240 год; 1 — 5 % інокуляту; 2 — 10; 3 — 15 %

Концентрація гексадекану у середовищі 2 при отриманні інокуляту 0,3 %; посівний матеріал з середини експоненційної фази росту. $K_s = 0,14 \text{ г О}_2/\text{л} \cdot \text{год}$

Таблиця 1.10

Вплив способу підготовки гексадекану на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1

Гексадекан	ПАР*	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
		Без розбавлення	1 : 9	1 : 49
Нативний	4,1	60,4	56,1	49,2
Емульгований	0,2	24,1	12,4	20,0

Примітка. Концентрація гексадекану у середовищі 2 при отриманні інокуляту становила 0,3 %, при культивуванні — 2 %; посівний матеріал (5 %) з середини експоненційної фази росту $K_s = 0,14 \text{ г O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$; тривалість культивування — 168 год.

з алкановою фракцією та спрощує його подальшу асиміляцію мікроорганізмами.

З метою полегшення транспорту гідрофобного субстрату у клітини *R. erythropolis* ЕК-1 та скорочення тривалості культивування у середовище вносили попередньо емульгований гексадекан. Експерименти показали, що використання такої форми субстрату призводить до блокування процесів синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями. Так, умовна концентрація ПАР на 168 год культивування становила лише 0,2, а індекс емульгування нативної та розбавленої культуральної рідини не перевищував 25 % (табл. 1.10).

Отже, максимальний синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 спостерігався за умови використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту у концентрації 10 %. Показано, що оптимальна концентрація гексадекану для вирощування інокуляту та утворення ПАР становить 1 %. Проте найвищі емульгувальні властивості культуральної рідини зафіксовані при використанні посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з 0,3 % гексадекану. Визначено, що використання емульгованого субстрату для вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 супроводжується пригніченням утворення ПАР.

Хімічний склад ліпідів, синтезованих у різних умовах культивування на гексадекані. Дослідження хімічного складу ліпідів, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 під час росту на гексадекані, показало, що всі досліджувані зразки (культуральна рідина, супернатант і клітини) характеризувалися наявністю вільних і асоційованих з клітинами ПАР (табл. 1.11). Згідно з даними, представленими у цій таблиці, усі зразки характеризувались наявністю трегалозоміколатів. Однак якісний склад гліколіпідів за-

Таблиця 1.11

Характеристика ліпідів, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з гексадеканом

Умови культивування	Локалізація ліпідів	Якісний склад	
		нейтральних ліпідів	гліко- і фосфоліпідів
Середовище 1; 1 % гексадекану; 1,0 г/л KNO_3 ; $K_s = 0,11$ г O_2 /л · год	Культуральна рідина	Цетиловий спирт, тригліцерид, метиловий ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти (залишки)	Трегалозодиміколат
	Супернатант Клітини	Те саме Цетиловий спирт, пальмітинова кислота, тригліцериди	Те саме » »
Середовище 2; 1 % гексадекану; 1,0 г/л KNO_3 ; $K_s = 0,11$ г O_2 /л · год	Культуральна рідина	Цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти, тригліцерид	Трегалозомономіколат Трегалозодиміколат
	Супернатант Клітини	Те саме » »	Те саме » »
Середовище 2; 1 % гексадекану; 1,0 г/л KNO_3 ; $K_s = 0,04$ г O_2 /л · год	Супернатант	Цетиловий спирт, тригліцерид	Трегалозодиміколат
Середовище 2; 2 % гексадекану; 1,3 г/л NaNO_3 ; 0,0001 г/л FeSO_4 ; $K_s = 0,11$ г O_2 /л · год	Культуральна рідина	Цетиловий спирт, тригліцерид, метиловий ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти, пальмітинова кислота, міколові кислоти, ефір жирної кислоти, метиловий ефір міколової кислоти, ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти	Трегалозодиміколат, трегалозомономіколат, фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, дифосфатидилгліцерин
	Супернатант	Те саме	Те саме

Закінчення табл. 1.11

Умови культивування	Локалізація ліпідів	Якісний склад	
		нейтральних ліпідів	гліко- і фосфолі- підів
Середовище 2; 2 % гексадекану; 1,3 г/л NaNO_3 ; 0,0001 г/л FeSO_4 ; $K_s = 0,11 \text{ г O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$	Клітини	Цетиловий спирт, метиловий ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти, пальмітинова кислота, міколової кислоти, ефір жирної кислоти, метиловий ефір міколової кислоти, ефір пентадеканової кислоти	Трегалозодиміколат, фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, дифосфатидилгліцерин

П р и м і т к а. Культивування здійснювали упродовж 168 год; посівний матеріал вирощували на ГКА.

лежав від умов культивування (складу середовища і коефіцієнта масообміну). Так, трегалозомоно- і трегалозодиміколати виявлено при вирощуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі 2 за коефіцієнта масообміну (K_s) 0,11 г $\text{O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$. При зниженні показника K_s у складі позаклітинних гліколіпідів був відсутній трегалозомономіколат. При культивуванні бактерій на середовищі 1 у складі позаклітинних і асоційованих з клітинами гліколіпідів виявлено тільки трегалозодиміколат.

Показано, що у разі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі трегалозоміколати не були виявлені або були зафіксовані у незначних кількостях у складі асоційованих з клітинами ПАР [35]. Це явище пояснюється тим, що *R. erythropolis* ЕК-1 вирощували на гідрофільному субстраті — етанолі, а трегалозоміколати полегшують споживання гідрофобних речовин і, як правило, містяться у клітинній стінці при культивуванні на гідрофобних субстратах [139, 143, 208].

Якісний склад нейтральних ліпідів, як і гліколіпідів, також залежав від умов культивування продуцента (табл. 1.11). Найширший спектр ліпідів синтезувався при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі 2 з 2 % гексадекану за наявності іонів натрію і заліза та K_s , що становив 0,11 г $\text{O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$. Слід зазначити, що за цих умов суттєво збільшувався вміст позаклітинних ліпідів і зменшувалась кількість ліпідів, асоційованих з клітинами, а також у складі синтезованих ПАР було виявлено фосфоліпіди і незначні кількості пептидоліпідів.

Таблиця 1.12

Базові рівні та інтервали варіювання незалежних керованих факторів експерименту

Фактор (x_i)	x_1	x_2	x_3
Базовий рівень (x_{i0})	144	2	1,25
Інтервал варіювання (Δx_i)	24	1	0,25
Верхній рівень ($x_{iв}$)	168	3	1,5
Нижній рівень ($x_{iн}$)	120	1	1

Таблиця 1.13

Матриця планування повного факторного експерименту (ПФЕ 2³)

N	z_0	z_1	z_2	z_3	z_1z_2	z_1z_3	z_2z_3	$z_1z_2z_3$	y_{k1}	y_{k2}	y_{k3}	$y_{сг}$
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	1,6	1,7	1,5	1,6
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	2,2	2,1	2,0	2,1
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	1,8	1,7	1,9	1,8
4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,5	2,4	2,6	2,5
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	2,4	2,7	2,8	2,6
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	3,4	2,5	3,5	3,1
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	2,9	3,1	3,8	3,3
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	4,5	4,0	4,8	4,4

Оптимізація процесу синтезу ПАР під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані. Методи математичного планування експериментів широко використовують для підбору живильних середовищ з метою збільшення виходу біомаси або накопичення важливих метаболітів мікроорганізмів. Вони дають змогу не тільки одночасно вивчити дію декількох факторів, а й кількісно оцінити ступінь цього впливу.

Одержано математичну модель процесу культивування у вигляді лінійного рівняння за методом повного факторного експерименту (ПФЕ 2³) [2] при послідовній зміні трьох незалежних керованих факторів — часу культивування (x_1), концентрації джерела вуглецю (x_2) та азоту (x_3). Базові рівні, інтервали варіювання, верхній та нижній рівні варіювання незалежних факторів представлено в табл. 1.12.

На першому етапі роботи проводили планування експерименту, тобто складали матрицю планування ПФЕ (табл. 1.13.). У N -х рядках матриці планування проводили підбір усіх можливих варіантів заданих верхніх і нижніх рівнів безрозмірних, нормованих факторів, кожному з яких присвоювали значення +1 чи -1, що значно полегшувало подальші розрахунки.

Таблиця 1.14

Перевірка вагомості коефіцієнтів регресії

N	Коефіцієнт							
	b_0^*	b_1^*	b_2^*	b_3^*	b_{12}^*	b_{13}^*	b_{23}^*	b_{123}^*
1	1,6	-1,6	-1,6	-1,6	1,6	1,6	1,6	-1,6
2	2,1	2,1	-2,1	-2,1	-2,1	-2,1	2,1	2,1
3	1,8	-1,8	1,8	-1,8	-1,8	1,8	-1,8	1,8
4	2,5	2,5	2,5	-2,5	2,5	-2,5	-2,5	-2,5
5	2,6	-2,6	-2,6	2,6	2,6	-2,6	-2,6	2,6
6	3,1	3,1	-3,1	3,1	-3,1	3,1	-3,1	-3,1
7	3,3	-3,3	3,3	3,3	-3,3	-3,3	3,3	-3,3
8	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
$\Sigma b/N$	2,7	0,4	0,3	0,7	0,1	0,1	0,2	0,1
t	42,28	5,65	4,99	10,77	1,71	0,92	2,63	0,92
$\text{sign}(t - t_{\text{кр}})$	1	1	1	1	-1	-1	1	-1

П р и м і т к а. Після визначення коефіцієнта $N(m - 1) = 16$ у межах статистичної похибки $q = 0,05$ знаходили табличне значення критерію Стюдента ($t_{\text{кр}} = 2,119$).

Результати проведених експериментів відповідно до варіантів варіювання плану заносили в табл. 1.13 як y_{k1} , y_{k2} , y_{k3} . Слід підкреслити, що зміна відгуку у регресії має випадковий характер, тому в кожній N -й точці проводили три паралельних досліди.

Перевірка відтворюваності експерименту. Для перевірки цієї гіпотези використовували критерій Кохрена, який визначали на основі оцінок дисперсій s_g^2 . Розрахунки показали, що емпіричне значення критерію Кохрена ($G = 0,51$) виявилось нижчим за його критичне табличне значення, яке становить 0,52; це співвідношення, в свою чергу, підтверджує відтворюваність даного експерименту відносно керованих факторів [2].

На етапі визначення математичної моделі об'єкта були розраховані значення незалежних оцінок — b_0 , b_i , $b_{\text{л}}$ (табл. 1.14), що відповідали коефіцієнтам β_0 , β_i , $\beta_{\text{л}}$ теоретичного рівняння регресії, яке безпосередньо описує математичну модель експерименту. Після оцінки значимості коефіцієнтів регресії за критерієм Стюдента (t) було виявлено, що вагомими в досліджуваному процесі культивування є коефіцієнти b_1^* , b_2^* , b_3^* і b_{23}^* , тобто ті, для яких підтверджується умова: $\text{sign}(t - t_{\text{кр}}) = +1$ (табл. 1.14). Відповідно вагомими будуть вважатися такі фактори: час культи-

ування, концентрація вуглецю, концентрація азоту та співвідношення вуглець : азот.

На основі коефіцієнтів та оцінки їх вагомості складено математичну модель експерименту у вигляді лінійного рівняння регресії (1.1, 1.2):

$$Y = b_0 + b_1 \cdot z_1 + b_2 \cdot z_2 + b_3 \cdot z_3 + b_{23} \cdot z_{23}, \quad (1.1)$$

$$Y = 2,7 + 0,4 \cdot z_1 + 0,3 \cdot z_2 + 0,7 \cdot z_3 + 0,2 \cdot z_{23}. \quad (1.2)$$

На останньому етапі роботи проводили перевірку *адекватності математичного опису* дослідним даним, для чого оцінювали відхилення передбаченої за отриманим рівнянням регресії величини відгуку $y_{\text{роз}}$ від експериментальних результатів $y_{\text{сп}}$ (середнє значення), на основі чого визначали F -критерій Фішера. Розраховане нами емпіричне значення критерію Фішера ($F_{\text{роз}} = 0,021421$) менше його критичного показника ($F_{\text{кр}} = 3,24$), який визначали за табличними даними. Отже, виконується умова $F_{\text{роз}} < F_{\text{кр}}$, яка дає змогу зробити висновок, що рівняння регресії адекватно описує досліджуваний процес, а вибрані форма математичного опису та інтервали варіювання Δx_i є допустимими.

Оптимізацію складу живильного середовища проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel, яка містить допоміжний статистичний пакет аналізу даних. За результатами аналізу цих даних встановлено, що оптимальні умови вирощування *R. erythropolis* ЕК-1, за яких синтез ПАР буде максимальним, такі: концентрація джерела вуглецю — 3 %, азоту — 1,5 г/л, тривалість культивування — 168 діб. Ці значення є граничними.

Під час експериментальних досліджень з'ясовано, що при внесенні у живильне середовище 3 % гексадекану вихід ПАР щодо концентрації заданого субстрату значно нижчий, ніж при використанні 2 % (див. табл. 1.5), а при збільшенні тривалості культивування не спостерігали підвищення синтезу ПАР.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено оптимальні для утворення ПАР умови культивування продуцента (концентрація гексадекану — 2 %, співвідношення вуглець/азот — 49 : 1, коефіцієнт масопереносу — 0,11—0,14 г $\text{O}_2/\text{л} \cdot \text{год}$), за яких синтез ПАР підвищується у 3—4 рази. Максимальний синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 спостерігався у разі використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту у концентрації 10 %.

У складі ліпідів, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані, виявлено широкий спектр нейтральних ліпідів (цетиловий спирт, пальмітинову кислоту, метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти, тригліцерид, міколові кислоти, ефір жирної кислоти, метиловий ефір міколової кислоти та ефір *n*-пентадеканової кислоти), гліколіпіди (трегалозомоно- і трегалозодиміколати), а також фосфоліпіди та слідові кількості пептидоліпідів. Встановлено, що якісний склад ліпідів залежить від умов культивування *R. erythropolis* ЕК-1.

1.3.2. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі періодичного культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210

У процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у колбах встановлено (див. підрозділ 1.3.1), що максимальне накопичення ПАР спостерігалось на середовищі з гексадеканом за таких умов: K_s системи — 0,14 г O_2 /л · год, посівний матеріал з середини експоненційної фази росту у концентрації 10 %. Зважаючи на отримані результати, наступний етап роботи полягав у вивченні особливостей синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями *R. erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментаторі, що дало змогу дослідити також вплив інших, важливих для біосинтезу параметрів (аерації, швидкості перемішування, режиму внесення субстрату, рН, температури культивування).

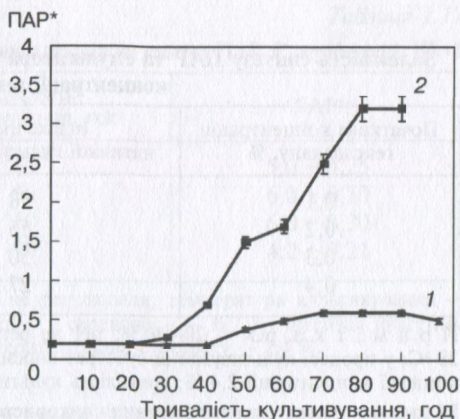
Вплив режиму внесення субстрату на синтез ПАР. При масштабуванні процесу (культивування у ферментаторі АК-210) зазначений вище спосіб одержання ПАР характеризувався занадто великою тривалістю культивування і невеликою кількістю синтезованих ПАР.

Встановлено, що висока початкова концентрація гексадекану (2 %) інгібує синтез біомаси і ПАР. За такого режиму внесення субстрату асиміляція гексадекану *R. erythropolis* ЕК-1 відбувалася дуже повільно, концентрація біомаси не перевищувала 0,7 г/л на 110 год культивування, а умовна концентрація ПАР досягала 0,6 (рис 1.6).

Відомо, що ефективним способом підвищення інтенсивності біосинтезу деяких продуктів мікробного синтезу (зокрема екзополісахаридів) є дробне внесення у середовище культивування порівняно

Рис. 1.6. Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від режиму внесення субстрату:

1 — одноразове внесення гексадекану (2 %); 2 — дробне внесення гексадекану (порціями по 0,1 % через 7–8 год). Умови культивування: pO_2 — 20–30 % насичення повітрям; температура культивування — 28 °С; рН не регулювали



малих порцій субстрату (див. підрозділ 1.1). Завдяки такій схемі внесення джерела вуглецю можна знизити «субстратне навантаження» на клітини продуцента, досягти повнішого використання субстрату та інтенсифікувати синтез цільового продукту.

Наші експерименти показали, що дробне внесення гексадекану помітно підвищило (порівняно з одноразовим) ефективність біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1. Так, внесення субстрату порціями по 0,1 % через 7–8 год культивування дало змогу у п'ять разів підвищити показник умовної концентрації ПАР (рис. 1.6). Проте за таких умов культивування тривалість лаг-фази становила 20–25 год. Ці дані можуть вказувати на те, що за такого режиму внесення субстрату концентрація гексадекану у середовищі була нижче оптимальної і культура перебувала у стані постійного «вуглецевого голодування».

У зв'язку з цим наступним етапом роботи було визначення оптимального для синтезу ПАР режиму внесення субстрату. Експерименти показали, що збільшення початкової концентрації гексадекану у середовищі до 0,2–0,3 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,2 % через 7–8 год дало змогу підвищити показник ПАР* до 4,2 (табл. 1.15). За такого способу подачі субстрату тривалість лаг-фази зменшувалась до 8–10 год.

Внесення гексадекану на початку культивування у концентрації 0,4–0,5 % призводило до блокування процесів синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями і негативно впливало на ріст продуцента.

Таким чином, найвищі показники синтезу ПАР спостерігали за початкової концентрації гексадекану 0,2–0,3 % (табл. 1.15). У

Таблиця 1.15

Залежність синтезу ПАР та емульгатора *R. erythropolis* ЕК-1 від початкової концентрації гексадекану

Початкова концентрація гексадекану, %	Індекс емульгування нативної культуральної рідини, %	ПАР*
0,1	$58 \pm 2,9$	$3,2 \pm 0,16$
0,2	$55 \pm 2,7$	$4,2 \pm 0,21$
0,3	$50 \pm 2,5$	$4,2 \pm 0,21$
0,4	$27 \pm 1,4$	$2,4 \pm 0,12$

П р и м і т к а. pO_2 — 20—30 %; рН не регулювали; температура культивування — 28 °С; у процесі культивування субстрат вносили порціями по 0,2 % кожні 7—8 год до кінцевої концентрації 2,4 %; тривалість культивування у всіх варіантах становила 80—85 год; як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Таблиця 1.16

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від інтервалу внесення гексадекану

Інтервал внесення гексадекану, год	Тривалість культивування, год	ПАР*
4	90	$4,3 \pm 0,22$
5	65	$5,0 \pm 0,25$
6	65	$5,0 \pm 0,25$
7	80	$4,2 \pm 0,21$

П р и м і т к а. pO_2 — 20—30 %; рН не регулювали; температура культивування — 28 °С; початкова концентрація гексадекану у середовищі — 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,2 % до кінцевої концентрації 2,4 %.

подальших експериментах визначали оптимальний проміжок часу між внесенням порцій гексадекану.

Встановлено, що зменшення інтервалу між подачею субстрату до 5—6 год дає змогу активізувати синтез поверхнево-активних речовин (ПАР* становила 5,0) і скоротити тривалість процесу біосинтезу до 65 год (табл. 1.16). Внесення субстрату через кожні 3—4 год супроводжувалось накопиченням його у середовищі, а не споживанням клітинами, і, як наслідок, зниженням швидкості росту бактерій (починаючи з 10—12 год) та синтезу ПАР. За таких умов культивування показник ПАР* досягав 4,3 лише на 90 год культивування *R. erythropolis* ЕК-1 (табл. 1.16).

Подальші експерименти показали, що за дробного внесення гексадекану порціями по 0,3—0,4 % у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210 показник ПАР* дося-

Таблиця 1.17

Вплив концентрації внесеного дробно гексадекану на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1

Концентрація внесеного дробно гексадекану, %	Тривалість культивування, год	ПАР*
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

П р и м і т к а. pO_2 — 20–30 %; pH не регулювали; температура культивування — 28 °С; початкова концентрація гексадекану у середовищі — 0,2 %; інтервал внесення порцій гексадекану — 5–6 год; кінцева концентрація субстрату — 2,4 %.

гав значення 6,0 вже на 60 год (табл. 1.17). Підвищення концентрації внесеного дробно гексадекану до 0,5 % призводило до зниження показників синтезу ПАР та збільшення тривалості процесу біосинтезу.

Вплив хімопсину на синтез ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Характерною особливістю росту *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з гексадеканом є здатність до коагуляції клітин та їх налипання на робочих поверхнях реактора. Такий характер росту ускладнює процеси транспорту кисню і субстрату у клітини бактерій. З метою одержання гомогенної суспензійної культури на початку культивування у середовище вносили препарат хімопсин. Препарати трипсину широко використовують для дезагрегації тканин і конгломератів клітин та відокремлення клітинного моношару від субстрату [14].

Експерименти показали, що за наявності ферментного препарату у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 не відбувалося агрегації клітин, культуральна рідина залишалася гомогенною впродовж усього процесу культивування. Проте за таких умов спостерігалися тривала адаптація клітин до умов культивування (тривалість лаг-фази збільшувалася до 50 год) і пригнічення синтезу ПАР. У зв'язку з цим досліджували вплив на ріст і синтез ПАР хімопсину під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 в колбах на качалці. Результати цих експериментів підтвердили, що за наявності в середовищі хімопсину зменшуються показник ПАР* і емульгувальні властивості культуральної рідини (табл. 1.18). Так, за внесення хімопсину у концентрації 0,025 мг/л показник ПАР* упродовж всього процесу культивування був майже у 2 рази нижчим, ніж за відсутності фер-

Таблиця 1.18

Синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за наявності хімопсину

Показник синтезу ПАР	Тривалість вирощування, год	Концентрація хімопсину, мг/л		
		без хімопсину	0,025	0,05
ПАР*	96	4,7 ± 0,23	2,1 ± 0,15	2,2 ± 0,14
	168	6,1 ± 0,30	3,6 ± 0,18	3,4 ± 0,15
	240	6,2 ± 0,31	3,8 ± 0,19	4,2 ± 0,21
Індекс емульгування, %	96	44,3 ± 2,21	32,5 ± 1,62	27,1 ± 1,35
	168	60,4 ± 3,02	35,8 ± 1,79	48,2 ± 2,41
	240	60,1 ± 3,00	40,5 ± 2,02	50,4 ± 2,52

Примітка. Концентрація гексадекану у середовищі при отриманні інокуляту — 0,3 %; посівний матеріал (5 %) з середини експоненційної фази росту; субстрат для емульгування — соняшникова олія.

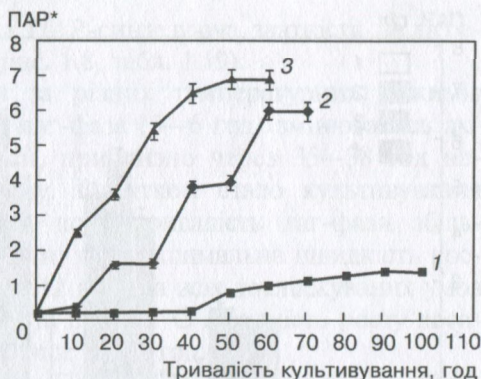
менту (табл. 1.18). Підвищення концентрації хімопсину у середовищі до 0,05 мг/л не супроводжувалось подальшим зниженням умовної концентрації ПАР, а її показник залишався у межах 2,2—4,2. У разі внесення у середовище хімопсину показник індексу емульгування культуральної рідини залишався сталим і не перевищував 30—40 % (табл. 1.18).

Утворення ПАР за різних режимів масообміну і аерації. Попередні дослідження показали (див. підрозділ 1.3.1), що у процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 в колбах високі показники синтезу ПАР спостерігалися за K_s системи 0,14 г O_2 /л · год. У зв'язку з цим було визначено швидкість перемішування і витрати повітря, за яких K_s у ферментаторі становить 0,14 г O_2 /л · год. Встановлено, що сульфітне число системи досягає цього значення за такого режиму роботи ферментатора: число обертів перемішувального пристрою — 250 об/хв, витрати повітря на аерацію — 0,2 л/л · хв. Визначені показники ступеня аерації та інтенсивності перемішування повністю відповідали режиму, що підтримувався у ферментаторі на початку процесу культивування бактерій.

Синтез ПАР у разі використання посівного матеріалу з ранньої експоненційної фази росту спостерігався лише за низької концентрації розчиненого кисню (20—30 %). За таких умов вирощування бактерій максимальне значення умовної концентрації ПАР становило лише 1,4 на 90 год (рис. 1.7). Підвищення концентрації розчиненого кисню до 60—80 % призводило до пов-

Рис. 1.7. Синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 залежно від концентрації розчиненого кисню у середовищі культивування і фізіологічного стану інокуляту:

1 — посівний матеріал з ранньої експоненційної фази росту; pO_2 — 20—30 %; 2 — посівний матеріал з середини експоненційної фази росту; pO_2 — 20—30 %; 3 — посівний матеріал з середини експоненційної фази росту; pO_2 — 60—70 %. Умови культивування: початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; pH не регулювали; температура культивування — 28 °C; концентрація інокуляту — 10 %



ного блокування процесів синтезу ПАР. Ми припускаємо, що інгібувальна дія кисню може бути пов'язана з високою чутливістю культури до його активних форм (пероксиду водню, супероксиданіону, гідропероксидних радикалів, гідроксидних радикалів тощо) на цій стадії росту.

Використання інокуляту з середини експоненційної фази дало змогу проводити процес культивування за вищих концентрацій розчиненого кисню (60—70 % насичення повітрям) та суттєво підвищити показники синтезу ПАР (рис. 1.7). За таких умов культивування спостерігався інтенсивний ріст бактерій, синтез ПАР починався з перших годин росту продуцента, умовна концентрація ПАР становила 6,5 на 40 год. За значень pO_2 20—30 % ПАР* досягала значення 6,0, проте тривалість культивування збільшувалась до 60—70 год (рис. 1.7). Слід зауважити, що культивування бактерій за високих концентрацій розчиненого кисню дало змогу суттєво зменшити агрегацію клітин та їх налипання на стінки ферментатора.

Вплив температури на синтез ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Раніше (див. підрозділ 1.3.1) було показано, що максимальне накопичення загальних ПАР (асоційовані та позаклітинні ліпіди) *R. erythropolis* ЕК-1 спостерігалось за температури 20 °C. Подальші дослідження показали, що оптимальною температурою для синтезу позаклітинних ПАР є 28 °C (рис. 1.8). При підвищенні температури до 30 °C показники синтезу ПАР майже не відрізнялися від результатів, одержаних за оптимальної температури культивування.

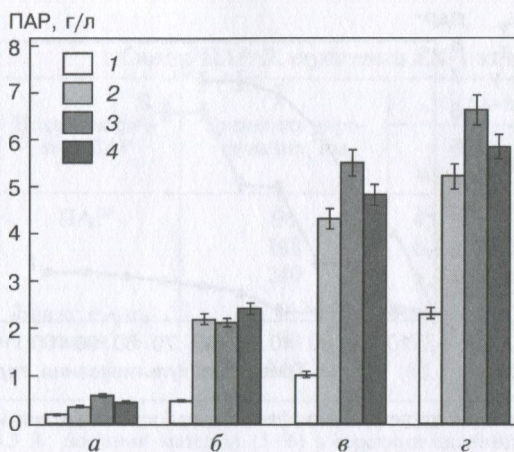


Рис. 1.8. Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від температури культивування:

1 — 20 °С; 2 — 25 °С; 3 — 28 °С; 4 — 30 °С; тривалість культивування: а — 12 год, б — 24 год, в — 36 год, г — 48 год. Початкова концентрація ПАР становила 0,005—0,008 г/л. Умови культивування: початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; pO_2 60—70 %; рН не регулювали

Так, в обох випадках характер зміни концентрації біомаси і ПАР у процесі культивування виявився подібним, зокрема концентрація ПАР на 48 год перебувала в межах 5,9—6,6 г/л, умовна концентрація ПАР досягала 6,7—6,9 вже на 40 год, а ПАР-синтезуюча здатність становила 2,86—3,14 г ПАР/г АСБ (рис. 1.8, табл. 1.19).

Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 за нижчих температур супроводжувалось інгібуванням процесу синтезу ПАР (рис. 1.8, табл. 1.19). Особливо чітко цей ефект спостерігався, коли температура культивування знижувалась до 20 °С. За таких умов концентрація

Таблиця 1.19

Показники росту *R. erythropolis* ЕК-1 і синтезу ПАР за різних температурних режимів

Температура, °С	$\mu_{\max}$, год ⁻¹	Час досягнення $\mu_{\max}$, год ⁻¹	ПАР, г/л	$P_{\max}$, год ⁻¹	Час досягнення $P_{\max}$, год ⁻¹	ПАР-синтезуюча здатність, г ПАР/г АСБ	Вихід ПАР від субстрату, %
20	0,11 ± 0,01	12	2,4 ± 0,12	0,16 ± 0,01	36	1,15 ± 0,06	16,1 ± 0,80
25	0,12 ± 0,01	6	5,6 ± 0,28	0,22 ± 0,01	30	2,67 ± 0,13	38,9 ± 1,94
28	0,12 ± 0,01	6	6,6 ± 0,33	0,34 ± 0,02	30	3,14 ± 0,16	44,0 ± 2,30
30	0,10 ± 0,01	6	5,9 ± 0,30	0,37 ± 0,02	30	2,86 ± 0,14	41,7 ± 2,08

П р и м і т к а. Початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; pO_2 60—70 %; рН не регулювали; концентрація біомаси (АСБ) у всіх варіантах становила 2,0—2,1 г/л; тривалість культивування 48 год.

ПАР досягала лише 2,4 г/л, а ПАР-синтезуюча здатність не перевищувала 1,15 г ПАР/г АСБ (рис. 1.8, табл. 1.19).

Динаміка росту бактерій за різних температурних режимів виявилась подібною: коротка лаг-фаза (5—6 год) змінювалась активним накопиченням біомаси, приблизно через 35—38 год наступала стаціонарна фаза росту. Винятком стало культивування *R. erythropolis* ЕК-1 при 20 °С, коли тривалість лаг-фази збільшилася до 10 год. Слід зауважити, що максимальна швидкість росту ($\mu_{\max}$) становила від 0,10 до 0,12 год⁻¹ за всіх досліджуваних умов культивування (табл. 1.19). Проте при 20 °С швидкість росту досягала максимального значення лише на 12 год.

Водночас швидкість синтезу ПАР ($P_{\max}$) залежала від температурного режиму і досягала максимального значення (0,37 год⁻¹) під час культивування бактерій при 30 °С (табл. 1.19). Проте за такої температури всі інші показники процесу (концентрація ПАР, ПАР-синтезуюча здатність, вихід ПАР від субстрату) виявилися дещо нижчими, ніж при 28 °С. Зниження температури культивування призводило до зменшення швидкості синтезу ПАР. Так, за температури 20 °С цей показник становив лише 0,16 год⁻¹ (табл. 1.19).

Зміна температури культивування в діапазоні 25—30 °С суттєво не впливала на вихід ПАР, який залишався у межах 39—44 % (табл. 1.19). Проте вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 за температури 20 °С призводило до інгібування процесу біосинтезу ПАР, у результаті чого вихід ПАР знижувався до 16 %.

Вплив рН на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1. На рис. 1.9 наведено типовий характер зміни рН, концентрації біомаси та ПАР у процесі періодичного культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з гексадеканом в оптимальних умовах, визначених раніше. Інтенсивний ріст бактерій і асиміляція субстрату починалися вже на 5—7 год культивування (після короткої лаг-фази) і супроводжувалися поступовим підвищенням рН до 8,2—8,4. Збільшення рН припинялося на 18—20 год, коли культура досягала середини експоненційної фази росту, і залишалося на рівні 8,2—8,4 до кінця процесу культивування бактерій. Встановлено, що накопичення ПАР відбувається впродовж усього процесу ферментації, починаючи з фази активного росту, і досягає максимуму на початку стаціонарної фази (рис. 1.9).

У попередніх експериментах культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснювали без регуляції рН. Відомо [87], що для більшості про-

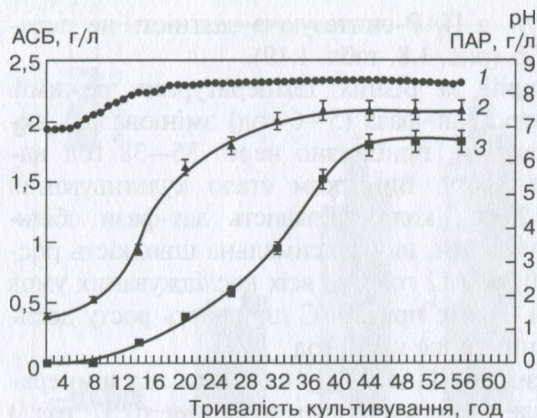


Рис. 1.9. Динаміка росту і синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані:

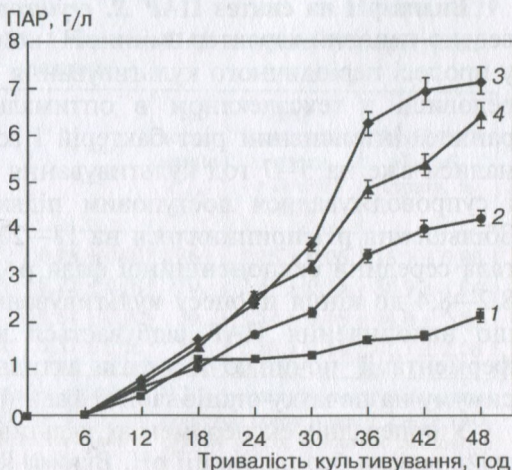
1 — рН; 2 — концентрація біомаси (АСБ); 3 — концентрація ПАР. Умови культивування: початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3–0,4 % кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; температура культивування — 28 °С; pO_2 — 60–70 %

дуцентів (*Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*) оптимальним для синтезу ПАР є значення рН у межах 6,5–7,0. Водночас для бактерій роду *Rhodococcus* таких даних у літературі не наведено. Тому наступним етапом роботи було визначення оптимального рН для синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями *R. erythropolis* ЕК-1.

Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 при рН 8,0 дало змогу суттєво інтенсифікувати синтез ПАР (рис. 1.10). За такого значення рН концентрація ПАР була найвищою і становила 7,15 г/л, а вихід ПАР від субстрату досягав майже 50 % (рис. 1.10, табл. 1.20). При цьому максимальна швидкість росту бактерій вия-

Рис. 1.10. Утворення ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за різних значень рН середовища:

1 — рН 7,0; 2 — 7,5; 3 — 8,0; 4 — 8,5. Умови культивування: початкова концентрація субстрату — 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3–0,4 % кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; температура культивування 28 °С; pO_2 — 60–70 %



Таблиця 1.20

Залежність показників синтезу ПАР і росту *R. erythropolis* ЕК-1 від рН середовища

рН	$\mu_{\max}$, год ⁻¹	ПАР, г/л	$P_{\max}$, год ⁻¹	Індекс емульгу- вання, %	ПАР- синтезуюча здатність, г ПАР/г АСБ	Вихід ПАР від субстра- ту, %
7,0	0,13 ± 0,01	2,13 ± 0,11	0,13 ± 0,01	100 ± 5,0	1,10 ± 0,05	14,79 ± 0,74
7,5	0,12 ± 0,01	4,22 ± 0,21	0,20 ± 0,01	68 ± 3,4	2,00 ± 0,10	29,30 ± 1,46
8,0	0,10 ± 0,01	7,15 ± 0,36	0,43 ± 0,02	50 ± 2,5	3,40 ± 0,17	49,65 ± 2,48
8,5	0,11 ± 0,01	6,41 ± 0,32	0,21 ± 0,01	52 ± 2,6	3,20 ± 0,16	47,29 ± 2,36

П р и м і т к а. Час досягнення $\mu_{\max}$ і $P_{\max}$ у всіх варіантах становив 6 та 30 год відповідно; початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; pO_2 — 60—70 %; температура культивування — 28 °С; концентрація біомаси (АСБ) — 2,0—2,1 г/л; тривалість культивування — 48 год; визначення емульгувальних властивостей проводили для нативної культуральної рідини; субстрат для емульгування — соняшникова олія.

вилась нижчою (0,10 год⁻¹) порівняно з аналогічними показниками, одержаними при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 за рН 7,0; 7,5 і 8,5 (табл. 1.20).

Зниження рН середовища до 7,0—7,5 супроводжувалося пригніченням процесу синтезу ПАР. Зокрема, за таких значень рН концентрація ПАР не перевищувала 2,13 і 4,22 г/л, а вихід ПАР від заданого субстрату знижувався відповідно до 14,8 і 29,3 % (рис. 1.10, табл. 1.20).

Встановлено, що максимальною швидкістю синтезу ПАР (0,43 год⁻¹) була у процесі культивування бактерій за рН 8,0 на 30 год (кінець експоненційної фази росту) (табл. 1.20). Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 за інших значень водневого показника призводило до зниження швидкості синтезу щонайменше в 2 рази.

Експерименти показали, що найвищий рівень ПАР-синтезуючої здатності спостерігався за рН 8,0—8,5 і знаходився у межах 3,2—3,4 г ПАР/г АСБ (табл. 1.20). Підтримання рН на рівні 7,5 призводило до різкого зниження ПАР-синтезуючої здатності (2,0 г ПАР/г АСБ), а при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 за нейтрального значення рН цей показник досягав лише 1,1 г ПАР/г АСБ.

Найвищий індекс емульгування культуральної рідини зафіксовано за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з рН 7,0 (табл. 1.20). Цікаво зазначити, що за таких умов культивування спостерігалися інгібування синтезу метаболітів з поверхнево-активними властивостями і повна перебудова механізмів

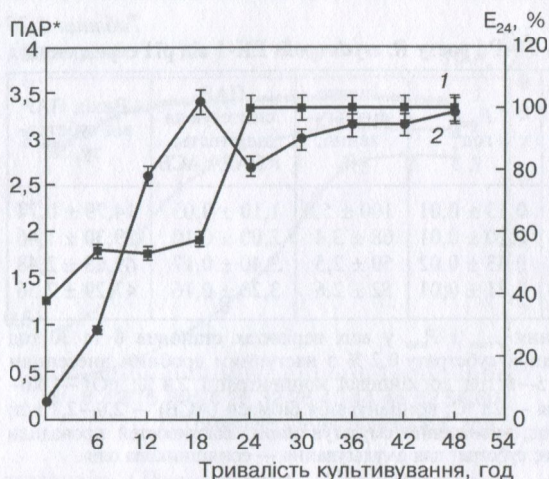


Рис. 1.11. Синтез *R. erythropolis* ЕК-1 метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за нейтрального значення рН:

1 — індекс емульгування; 2 — ПАР. Умови культивування: початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; температура культивування 28 °С; рО₂ — 60—70 %; рН 7,0. Емульгувальні властивості наведено для нативної культуральної рідини; субстрат для емульгування — соняшникова олія

біосинтезу ПАР на накопичення емульгатора. Так, починаючи з 18 год, показник ПАР* майже не змінювався, залишаючись на рівні 2,7—3,4 (рис. 1.11). При цьому на 24 год росту індекс емульгування досягав 100 % і залишався сталим упродовж усього процесу культивування.

Хімічний склад позаклітинних ліпідів, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у процесі періодичного культивування. Попередні дослідження показали (підрозділ 1.3.1), що під час культивування в колбах на качалці *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами метаболіти з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями. У складі ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані, було виявлено нейтральні ліпіди і гліколіпіди, якісний склад яких залежав від умов культивування (складу середовища та коефіцієнта масопереносу).

Подальші експерименти показали, що під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210 склад ПАР також залежав від рН середовища. Найбільший спектр ліпідів синтезувався бактеріями за рН 8,0 (табл. 1.21). Так, у складі позаклітинних ліпідів було виявлено гліколіпіди (трегалозо-6-ацилати, трегалозо-6-міколати, трегалозодіацилати, трегалозо-6-6'-диміколати), нейтральні ліпіди (міколові та жирні кислоти, триацилгліцероли, цетиловий спирт; метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти) та фосфоліпіди (табл. 1.21). Якщо рН знижувався до 7,0, у складі полярних ліпідів були відсутні трегалозо-6-6'-диміколати,

Таблиця 1.21

Залежність якісного складу ліпідів від рН середовища

рН	Полярні ліпіди	Неполярні ліпіди
7,0	Трегалозо-6-ацилати; трегалозо-6-міколати; трегалозодіацилати; міколові кислоти; 3-кето-2-алкіл жирні кислоти; триацилгліцероли	Цетиловий спирт; метиловий ефір- <i>n</i> -пентадеканової кислоти
7,5	Те саме	Те саме + фосфоліпіди
8,0	Те саме + трегалозо-6-6'-диміколати	Те саме

Примітка. Початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; температура процесу — 28 °С; pO_2 — 60—70 %; тривалість культивування — 48 год; якісний аналіз ліпідів проводили методом ТШХ у системах розчинників: полярна система: хлороформ—метанол—вода (65 : 15 : 2); неполярна система: гексан—дітиловий ефір (2 : 1).

а у складі неполярних ліпідів було виявлено лише цетиловий спирт та метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти. За підтримання рН на рівні 7,5 у складі позаклітинних ліпідів не ідентифікували лише трегалозо-6-6'-диміколати (табл. 1.21).

На наступному етапі роботи було досліджено зміну хімічного складу ліпідів упродовж процесу культивування *R. erythropolis* ЕК-1 за оптимальних для синтезу ПАР умов (дробне внесення субстрату, посівний матеріал з середини експоненційної фази росту, концентрація інокуляту 10 %; температура культивування 28 °С, рН 8,0).

Вихідні зразки супернатанту культуральної рідини (2 та 4 год культивування) характеризувалися наявністю слідових кількостей міколових кислот та цетилового спирту (табл. 1.22). Активний синтез нейтральних ліпідів спостерігався вже на 6 год культивування бактерій, зокрема у супернатанті культуральної рідини було виявлено неполярні ліпіди — цетиловий спирт і метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти — та полярні — міколові кислоти і триацилгліцероли (табл. 1.22.) При цьому на 12 год у складі позаклітинних ліпідів з'являлися фосфоліпіди, а на 30 год — 3-кето-2-алкіл жирні кислоти.

Накопичення гліколіпідів у супернатанті культуральної рідини зафіксовано лише на 18 год культивування *R. erythropolis* ЕК-1 (табл. 1.22). Першими у супернатанті культуральної рідини було виявлено трегалозодіацилати, а на 30 год вирощування бактерій у складі гліколіпідів було зафіксовано трегалозо-6-ацилати.

З літературних джерел відомо [143], що трегалозоміколати залишаються асоційованими з клітинними стінками *Rhodococcus*

Таблиця 1.22

Якісний склад позаклітинних ліпідів у процесі періодичного культивування
R. erythropolis ЕК-1 в оптимальних умовах

Тривалість культивування, год	Загальні ліпіди	Гліколіпіди
6	Міколові кислоти; триацилгліцери; цетиловий спирт; метиловий ефір <i>n</i> -пентадеканової кислоти	Не виявлено
12	Те саме + фосфоліпіди	» »
18	Те саме	» »
24	» »	Трегалозодіацилати
30	Те саме + 3-кето-2-алкіл жирні кислоти	Те саме + трегалозо-6-ацилати
36	Те саме	Те саме + трегало-6-міколати; трегалозо-6-б'-диміколати
42	» »	Те саме
48	» »	» »

П р и м і т к а. Початкова концентрація субстрату — 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3—0,4 % кожні 5—6 год до кінцевої концентрації 2,4 %; температура культивування — 28 °С; рН — 8,0; рО₂ — 60—70 %; якісний аналіз ліпідів проводили методом ТШХ в системах розчинників: полярна система: хлороформ—метанол—вода (65 : 15 : 2); неполярна система: гексан—дітиловий ефір (2 : 1).

упродовж всього періоду асиміляції гідрофобного субстрату, що дає змогу мікроорганізмам інтенсифікувати цей процес. Накопичення позаклітинних трегалозомоно- і трегалозодиміколатів заереєстровано лише на 36 год культивування *R. erythropolis* ЕК-1 (кінець експоненційної фази росту), що дало можливість підтвердити існуючі дані про роль цих сполук у взаємодії клітин з гідрофобним субстратом.

У результаті проведених досліджень встановлено, що максимальний синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210 спостерігався за такого режиму подачі субстрату: початкова концентрація гексадекану у середовищі 0,2—0,3 % з наступним дробним внесенням через 6—7 год порціями по 0,3—0,4 % до кінцевої концентрації 2,4 %. Використання зазначеного способу подачі субстрату дало змогу скоротити у 2 рази тривалість культивування (з 110 до 60 год) і підвищити у понад 6 разів (з 0,6 до 6,0) умовну концентрацію ПАР. Встановлено, що за підтримання рН середовища на рівні 8,0 можна інтенсифікувати синтез метаболітів з поверхнево-активними властивос-

тями. За такого режиму культивування концентрація позаклітинних ПАР становила 7,15 г/л, а вихід ПАР щодо заданого субстрату досягав 50 %. Водночас найвищий індекс емульгування культуральної рідини (100 %) було зафіксовано за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 при рН 7,0.

ПАР, синтезовані *R. erythropolis* ЕК-1 в оптимальних умовах культивування, являють собою комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів. Гліколіпіди представлені трегалозодіацилатами, трегалозо-6-ацилатами, трегало-6-міколатами, трегалозо-6-6'-діміколатами. У складі нейтральних ліпідів виявлено міколові кислоти, триацилгліцероли, цетиловий спирт, метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти, 3-кето-2-алкіл жирні кислоти.

1.3.3. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин у процесі росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на етанолі

Штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 ізолювано із забрудненого нафтою ґрунту. Штам депоновано в Депозитарії мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного) за номером ІМВ В-7241.

Він характеризується такими морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними ознаками. Клітини *A. calcoaceticus* К-4 в експоненційній фазі росту являють собою короткі палички, у стаціонарній — сферичні (кокоподібні), розміщені попарно, рідше — у коротких ланцюжках. Розміри клітин становлять 0,9—1,5 × 1,2—2,0 мкм. Спор не утворюють. Розмноження клітин здійснюється бінарним поділом. Клітини грамнегативні, нерухомі.

У процесі росту на МПА утворює слизові, прозорі колонії білого кольору з рівними краями, поверхня колоній гладенька, розмір колоній 2—3 мм.

Під час культивування *A. calcoaceticus* К-4 на рідких мінеральних середовищах з гідрофільними субстратами (етанолом, глюкозою) утворюється однорідна гомогенна суспензія клітин молочного кольору, іноді — з жовтуватим відтінком. У процесі вирощування на гідрофобних субстратах (рідкі парафіни) часто утворюються конгломерати клітин, а також спостерігається часткова їх флотація. Культивування *A. calcoaceticus* К-4 на середовищі з нафтою супроводжується коалесценцією нафти: за концентрації нафти 0,06 % (об'ємна частка) утворюються кульки діаметром 3—4 мм, а за 0,12 % нафти — диски діаметром до 7—8 мм і завтовшки 1—2 мм.

Як джерело вуглецю і енергії використовує глюкозу, етанол, рідкі парафіни, гексадекан, а також здатний асимілювати нафту, гліцерин. Як джерело азотного живлення використовує органічний (сечовину) та мінеральний (нітратний, гірше амонійний) азот.

Не потребує факторів росту, проте рівень біомаси і синтезованих ПАР підвищується за наявності у середовищі дріжджового автолізу.

Строгий аероб. Каталазопозитивний, оксидазонегативний, кислотноестійкий. Желатину не розріджує, крохмаль не гідролізує, нітрати не відновлює. Сірководень, індол та ацетоїн не утворює.

Температурний діапазон росту 10—42 °С. Оптимальна температура росту 24—30 °С. Росте у діапазоні рН 5,5—8,0. Оптимум рН 6,5—7,5.

З літератури відомо, що більшість представників роду *Acinetobacter* продукують високомолекулярні ПАР, яким притаманні емульгувальні, але не поверхнево-активні властивості [209, 252, 261]. Найдослідженішими на теперішній час є емульсан (продуцент *A. calcoaceticus* RAG-1 [105], нова назва — *A. venetianus* RAG-1 [59], *A. calcoaceticus* BD4 [128]), алазан (продуцент *A. radioresistens* K53 і KA53 [175]), дисперсан (продуцент *A. calcoaceticus* A2 [210]). За хімічною природою ці біосурфактанти є комплексами позаклітинних полісахаридів і білків. Синтез цих емульгаторів здійснюється за умов росту продуцентів як на гідрофільних (етанол, ацетат), так і на гідрофобних (гексадекан та інші вуглеводні) субстратах [209].

Утворення ПАР, як і інших продуктів мікробного синтезу, залежить від умов вирощування продуцента, зокрема природи і концентрації джерел вуглецевого і азотного живлення, співвідношення С/Н, рН, температури, тривалості культивування та інших факторів [87, 166, 209, 216].

Синтез ПАР за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на етанолі та гексадекані. Показники синтезу ПАР у процесі вирощування *A. calcoaceticus* К-4 на середовищах 1 і 2 з різними концентраціями етанолу і гексадекану наведено у табл. 1.23. Склади середовищ 1 і 2 аналогічні тим, які використовували для культивування *R. erythropolis* ЕК-1 (див. підрозділ 1.3.1).

З наведених у табл. 1.23 даних випливає, що синтез ПАР *A. calcoaceticus* К-4 залежить від складу живильного середовища, природи і концентрації джерела вуглецевого живлення. Найвищі значення ПАР* зафіксовано у процесі вирощування бактерій

Таблиця 1.23

Утворення ПАР під час росту *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі та гексадекані

Джерело вуглецю	Середовище	Концентрація джерела вуглецю, %	ПАР*	Індекс емульгування культуральної рідини, %		
				Без розбавлення	1 : 9	1 : 49
Етанол	1	1	$1,3 \pm 0,06$	45 ± 2	44 ± 2	44 ± 2
		2	$1,4 \pm 0,07$	45 ± 2	42 ± 2	44 ± 2
		3	$1,0 \pm 0,04$	43 ± 2	41 ± 2	48 ± 2
	2	1	$0,3 \pm 0,01$	43 ± 2	44 ± 2	41 ± 2
		2	$0,7 \pm 0,03$	43 ± 2	42 ± 2	42 ± 2
		3	$0,8 \pm 0,03$	46 ± 2	48 ± 2	44 ± 2
Гексадекан	1	1	$0,8 \pm 0,03$	28 ± 1	29 ± 1	33 ± 1
		2	$0,7 \pm 0,03$	32 ± 1	30 ± 1	31 ± 1
		3	$0,7 \pm 0,03$	42 ± 2	39 ± 2	34 ± 1
	2	1	$1,1 \pm 0,04$	42 ± 2	37 ± 1	27 ± 1
		2	$2,0 \pm 0,1$	35 ± 1	36 ± 1	24 ± 1
		3	$1,5 \pm 0,08$	36 ± 1	23 ± 1	27 ± 1

Примітка. Посівний матеріал вирошено на МПА, тривалість культивування — 168 год.

Таблиця 1.24

Вплив природи джерела азоту на синтез ПАР під час росту *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі

Концентрація етанолу, %	Джерело азоту	ПАР*	Індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини, %
2	KNO ₃	$0,75 \pm 0,04$	42 ± 2
	NaNO ₃	$0,6 \pm 0,03$	37 ± 2
	NH ₄ NO ₃	$0,65 \pm 0,03$	18 ± 1
	NH ₄ Cl	$0,65 \pm 0,03$	38 ± 2
	(NH ₂) ₂ CO	$1,4 \pm 0,07$	90 ± 4
3	KNO ₃	$0,8 \pm 0,04$	44 ± 2
	NaNO ₃	$0,9 \pm 0,04$	48 ± 2
	NH ₄ NO ₃	$0,9 \pm 0,04$	10 ± 1
	NH ₄ Cl	$0,95 \pm 0,04$	39 ± 2
	(NH ₂) ₂ CO	$1,5 \pm 0,07$	65 ± 3

Примітка. Культивування здійснювали на середовищі 2; концентрації джерел азоту еквімолярні за азотом концентрації KNO₃ (1,0 г/л); посівний матеріал вирошено на МПА, тривалість культивування — 168 год, співвідношення C/N — 60 і 89 для відповідно 2 і 3 % етанолу.

на середовищі 1 з 2 % етанолу і середовищі 2 з 2 % гексадекану. Вищі значення індексу емульгування встановлено для культуральної рідини, одержаної після вирощування штаму на середовищах з етанолом. Слід зазначити, що навіть після розведення культуральної рідини у 50 разів індекс емульгування не знижувався.

Подальші експерименти були присвячені визначенню оптимальних умов синтезу ПАР під час росту *A. calcoaceticus* К-4 на середовищі 2 з етанолом. Це було зумовлено такими причинами. По-перше, етанол є дешевшим і технологічнішим субстратом, ніж водонерозчинний гексадекан. По-друге, середовище 2 є дешевшим порівняно з середовищем 1 (вміст солей становить 9 і 2,84 г/л відповідно).

Залежність синтезу ПАР від природи джерела азоту. Дослідження впливу природи джерела азотного живлення на синтез ПАР у процесі вирощування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі (табл. 1.24) показало, що найвищі значення ПАР* (1,4—1,5) і E_{24} (65—90 %) спостерігались за наявності у середовищі $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (сечовини).

Вплив співвідношення С/Н і тривалості культивування на синтез ПАР. На наступному етапі досліджували синтез ПАР залежно від співвідношення С/Н у середовищі культивування *A. calcoaceticus* К-4 і тривалості вирощування продуцента (табл. 1.25).

Експериментальні дані, наведені у табл. 1.25, засвідчують, що у процесі росту продуцента на середовищі з етанолом змінюється співвідношення синтезованих метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями. Так, максимальне значення ПАР* фіксувалося на 120 год росту, у той час як індекс емульгування був найвищим на 168 год культивування. Оптимальним для синтезу ПАР було співвідношення С/Н, що дорівнювало 60. Слід зазначити, що за такого співвідношення спостерігали також максимальну умовну концентрацію ПАР у процесі росту продуцента на середовищі, в якому концентрація етанолу становила 1 і 3 %.

Залежність синтезу ПАР від якості посівного матеріалу. Дослідження впливу способу підготовки посівного матеріалу на утворення ПАР *A. calcoaceticus* К-4 показало, що найвищі показники синтезу спостерігались при використанні 10 % інокуляту з кінця експоненційної фази росту (табл. 1.26). За таких умов індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини досягав 60 %, а умовна концентрація ПАР збільшувалась до 2,9.

Таблиця 1.25

Вплив співвідношення C/N і тривалості культивування на синтез ПАР
A. calcoaceticus K-4

Концентрація (NH ₂) ₂ CO, г/л	Співвідно- шення C/N	Тривалість росту, год	ПАР*	Індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини, %
0,60	30	72	0,75 ± 0,03	52 ± 3
		120	1,4 ± 0,06	65 ± 3
		168	1,15 ± 0,05	73 ± 4
0,50	36	72	0,9 ± 0,04	70 ± 4
		120	1,6 ± 0,07	45 ± 2
		168	1,1 ± 0,05	70 ± 4
0,40	44	72	0,9 ± 0,04	60 ± 3
		120	1,7 ± 0,08	65 ± 3
		168	1,25 ± 0,05	80 ± 4
0,35	51	72	1,0 ± 0,05	55 ± 3
		120	1,65 ± 0,08	60 ± 3
		168	1,3 ± 0,06	70 ± 4
0,30	60	72	1,2 ± 0,06	70 ± 4
		120	2,0 ± 0,1	50 ± 3
		168	1,4 ± 0,06	90 ± 5
0,25	72	72	0,8 ± 0,04	40 ± 2
		120	1,5 ± 0,07	50 ± 3
		168	1,0 ± 0,05	60 ± 3

П р и м і т к а. Посівний матеріал вирощено на МПА; культивування здійснювали на середовищі 2; концентрація етанолу — 2 %.

Вплив факторів росту на синтез ПАР. З літератури відомо, що наявність у середовищі культивування мікроелементів і факторів росту є сприятливою умовою для синтезу ПАР багатьма мікроорганізмами [87, 166, 209]. Наші експерименти показали, що за одночасної наявності у середовищі з етанолом дріжджового автолізу і мікроелементів умовна концентрація ПАР і індекс емульгування зростали відповідно до 3,6 і 96 % (табл. 1.27).

Таким чином, у результаті дослідження впливу зовнішніх факторів на утворення ПАР штамом *A. calcoaceticus* K-4 встановлено оптимальні умови культивування продуцента на етанолі, що забезпечують максимальні показники синтезу ПАР. Такими умовами є: концентрація етанолу 2 %, концентрація сечовини 0,3 г/л, спів-

Таблиця 1.26

Залежність синтезу ПАР *A. calcoaceticus* К-4 від способу підготовки посівного матеріалу

Фаза росту інокуляту	Концентрація інокуляту, %	ПАР*	Індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини, %
Початок експоненційної фази	5	$1,65 \pm 0,08$	70 ± 4
	10	$1,8 \pm 0,08$	80 ± 4
	15	$1,8 \pm 0,08$	90 ± 5
Середина експоненційної фази	5	$2,0 \pm 0,1$	60 ± 3
	10	$2,1 \pm 0,1$	60 ± 3
	15	$2,4 \pm 0,12$	70 ± 4
Кінець експоненційної фази	5	$2,6 \pm 0,13$	58 ± 3
	10	$2,9 \pm 0,14$	60 ± 3
	15	$2,4 \pm 0,12$	60 ± 3
Контроль (посівний з МПА)	—	$2,0 \pm 0,1$	50 ± 3

П р и м і т к а. Одержання посівного матеріалу і культивування здійснювали на середовищі 2; концентрація етанолу — 2 %; концентрація сечовини — 0,3 г/л; співвідношення С/Н — 60; тривалість культивування — 120 год.

Таблиця 1.27

Вплив мікроелементів і дріжджового автолізу на синтез ПАР *A. calcoaceticus* К-4

Наявність у середовищі		ПАР*	Індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини, %
мікроелементів	дріжджового автолізу		
—	—	$2,9 \pm 0,14$	60 ± 3
+	—	$2,8 \pm 0,13$	95 ± 5
—	+	$3,0 \pm 0,15$	85 ± 5
+	+	$3,6 \pm 0,18$	96 ± 5

П р и м і т к а. Культивування здійснювали на середовищі 2; концентрація етанолу — 2 %; концентрація сечовини — 0,3 г/л, співвідношення С/Н — 60; інокулят з кінця експоненційної фази росту у кількості 10 %, тривалість культивування — 120 год.

відношення С/Н 60, наявність у середовищі мікроелементів та дріжджового автолізу, тривалість культивування 120 год, використання 10 % посівного матеріалу, вирощеного на мінерально-му середовищі з етанолом до кінця експоненційної фази росту.

Хімічний склад ПАР, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* К-4. Якісний склад ліпідів, екстрагованих з культуральної рідини після вирощування *A. calcoaceticus* К-4 у різних умовах на середовищі з етанолом, наведено у табл. 1.28. Встановлено, що у процесі культивування штаму К-4 в оптимальних умовах основними компонентами органічного екстракту є гліколіпіди (трегалозомоно- і трегалозодиміколати, трегалозодіацилати), пептидоліпіди та широкий спектр нейтральних ліпідів (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, C_{13} - C_{18} -*n*-алканоли; C_{11} - C_{22} -*n*-алканові та C_{13} - C_{18} -*цис-n*-алкенові кислоти; міколові кислоти та ін.). У неоптимальних умовах біосинтез ліпідів обмежений: гліколіпіди представлені лише трегалозомономіколатами, а нейтральні ліпіди — цетиловим спиртом, триацилгліцерилами і фосфатидною кислотою. Цікаво, що якісний склад ліпідів, синтезованих *A. calcoaceticus* К-4 в оптимальних умовах культивування на етанолі (табл. 1.28), близький до складу ліпідів, які утворює *Rhodococcus erythropolis* DSM43215 під час росту на *n*-алканах [139].

Таблиця 1.28

Якісний склад ліпідів, синтезованих *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі

Умови культивування	Ліпіди (полярна система)		Ліпіди (неполярна система)	
	Хлороформ—метанол—вода (85 : 15 : 1)	Хлороформ—метанол—вода (65 : 15 : 2)	Гексан—діетиловий ефір (2 : 1)	Гексан—діетиловий ефір—оцтова кислота (90 : 10 : 1)
До оптимізації*	Трегалозомономіколати	Триацилгліцерили, фосфатидна кислота	Цетиловий спирт	Не виявлено
Після оптимізації**	Те саме	1,2-Метильовані ненасичені вуглеводні; 3-кет-2-алкіл жирні кислоти; C_{13} - C_{18} - <i>n</i> -алканоли; C_{11} - C_{22} - <i>n</i> -алканові та C_{13} - C_{18} - <i>цис-n</i> -алкенові кислоти; міколові кислоти; трегалозодиміколати; трегалозоацилати	Цетиловий спирт; пальмітинова кислота	Цетиловий спирт; пальмітинова кислота

Примітка. Ліпіди екстрагували з культуральної рідини. * Джерело азоту KNO_3 (1,0 г/л), інокулят з МПА. ** Джерело азоту $(NH_2)_2CO$ (0,3 г/л), інокулят, вирощений на рідкому середовищі з етанолом до кінця експоненційної фази росту (10 %). Наявність у середовищі дріжджового автолізу і мікроелементів; тривалість культивування — 120 год.

Ліпіди, екстраговані з клітин *A. calcoaceticus* K-4, представлені трегалозомономіколатами, трегалозодіацилатами, C_{11} — C_{22} -*n*-алкановими і C_{13} — C_{18} -*цис-n*-алкеновими кислотами. Отже, за умов росту на етанолі *A. calcoaceticus* K-4 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР. Слід зазначити, що наявність трегалозоміколатів у клітинних стінках є особливістю бактерій роду *Rhodococcus* [209] і не характерна для представників роду *Acinetobacter*. Більше того, нам не вдалося знайти літературні дані, які б засвідчували здатність бактерій роду *Acinetobacter* синтезувати гліко-, пептидо- і нейтральні ліпіди, яким притаманні поверхнево-активні властивості.

1.4. Оптимізація умов культивування продуцентів авермектинів (макролідних антибіотиків)

1.4.1. Авермектин: хімічна структура і біосинтез

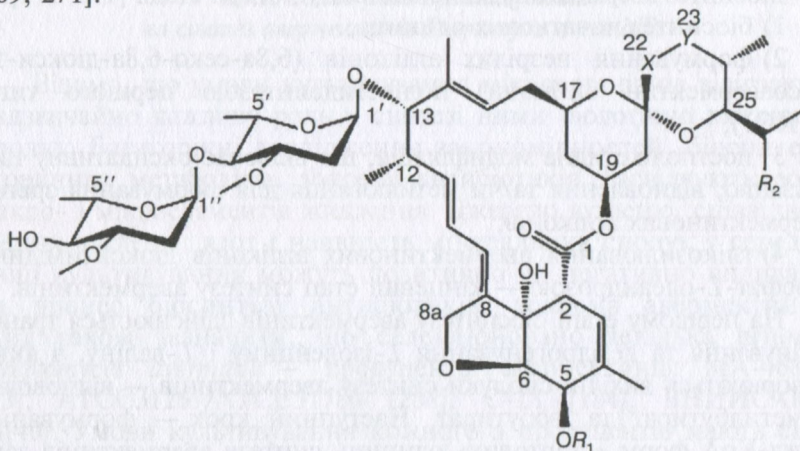
Останні десятиліття все більшого поширення набувають препарати на основі макролідного антибіотика авермектину, що продукується ґрунтовим стрептоміцетом *Streptomyces avermitilis* [73]. Цей антибіотик є комплексною субстанцією, яка складається з 8 компонентів: чотирьох мажорних (A_{1a} , A_{2a} , B_{1a} , B_{2a}) і чотирьох мінорних (A_{1b} , A_{2b} , B_{1b} і B_{2b}). Співвідношення *A*- і *B*-груп компонентів у комплексі залежить від особливостей штаму-продуцента, а також від умов його культивування. Компоненти авермектину можна розділити на окремі самостійно діючі речовини, їх називають по-різному — фракціями, компонентами, авермектинами, а в цілому — авермектиновим комплексом, авермектинами або комплексом авермектинів. Основна маса авермектину накопичується в міцелії продуцента і виділяється екстракцією органічними розчинниками [20, 73, 204].

Для *B*-компонентів характерна антипаразитарна дія, а для *A*-компонентів — протипухлинна [163, 173]. Антипаразитарна дія авермектинів проявляється у блокуванні передачі сигналу від центральних інтернейронів до збудливих периферичних мотонейронів у нематод і від гальмівних мотонейронів до м'язів у комах. Приєднуючись до рецепторів глутамату чи γ -аміномасляної кислоти, авермектин відкриває зв'язані з ними хлор-іонні канали і, таким чином, призводить до гіперполяризації мембран клітин, внаслідок чого передача нейронного сигналу гальмується, настає параліч і смерть безхребетного [68, 129, 136]. Поряд із

нейротоксичною дією авермектини пригнічують синтез хітину. За антипаразитарними властивостями найактивнішими є авермектини групи *B* — *B*_{1a} і *B*_{2a} [114].

На основі комплексу авермектинів або окремих його компонентів створено ряд препаратів, що застосовуються у рослинництві та ветеринарії (фітоверм, актофіт, аверсектин С, вертимек, абамектин та ін.).

За хімічною структурою кожний компонент авермектинового комплексу являє собою 16-членний лактон (рис. 1.12), зв'язаний із залишками двох молекул α -*L*-олеандрози (α -*L*-oleandrosyl- α -*L*-oleandroside). Компоненти авермектину різняться замінниками у положеннях C₅, C_{22–23} і C₂₆; до їх лактонних частин входять по одній молекулі 2-метилбутирату (група *A*) або ізобутирату (група *B*), по 7 молекул ацетату та 5 молекул пропіонату [20, 63, 117, 169, 271].



		<i>R</i> 1	<i>R</i> 2	<i>X</i> - <i>Y</i>
Авермектини	<i>A</i> 1a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
	<i>A</i> 1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
	<i>A</i> 2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
	<i>A</i> 2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
	<i>B</i> 1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
	<i>B</i> 1b	H	CH ₃	CH=CH
	<i>B</i> 2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
	<i>B</i> 2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

Рис. 1.12. Хімічна структура авермектинів [169]

Авермектини групи *A* у положенні C_5 містять метоксигрупу, *B* — гідроксигрупу, у авермектинів підгрупи *I* у C_{22-23} розташований подвійний зв'язок, а у підгрупи *II* — гідроксигрупа у положенні C_{23} . Авермектини групи *A* утворюються метилюванням у C_5 положенні авермектинів групи *B*, а сполуки підгрупи *I* — внаслідок дегідратації у положенні C_{23} підгрупи *II*. Підгрупа *a* як початкову одиницю синтезу використовує 2-метилпропаноїл, який перетворюється на етильну групу у положенні C_{26} , а підгрупа *b* — 2-метилбутанол, який забезпечує утворення метильної групи у C_{26} . Лактонна частина утворюється з однієї молекули 2-метилбутирату (авермектини групи *A*, де $P5$ — це метил) або ізобутирату (авермектини групи *B*), 7 молекул ацетату і 5 молекул пропіонату, тобто саме з тих нижчих жирних кислот, які є попередниками у біосинтезі жирних кислот у клітинах актиноміцетів [75, 184].

Біосинтез авермектину здійснюється у чотири стадії [190, 271]:

- 1) біосинтез початкових одиниць;
- 2) формування незрілих агліконів (6,8а-секо-6,8а-діокси-5-оксоавермектин аглікони) полікетидсинтазою першого типу (ПКС1);
- 3) постполікетидна модифікація, що включає оксидативну циклізацію, відновлення та/чи метилювання для формування зрілих авермектинових агліконів;
- 4) глікозилювання авермектинових агліконів діокситимідинфосфат-*L*-олеандрозою — кінцевий етап синтезу авермектинів.

На першому етапі біосинтезу авермектинів здійснюється трансамінування та дегідрогенування *L*-ізолейцину і *L*-валіну, з яких утворюються вихідні сполуки синтезу авермектинів — відповідно 2-метилбутират та ізобутират. Наступний крок — формування ацил-КоА форм «стартових» одиниць синтезу авермектинів завдяки трансаміназній та дегідрогеназній реакціям. У геномі *Streptomyces avermitilis* наявні 2 кластери генів (*bkdABC* і *bkdFGH*), що кодують $E1\alpha$, $E1\beta$ і E_2 -субодиниці дегідрогенази розгалужених α -кетокислот [86, 116, 230].

На другому етапі відбувається нарощування ланцюга полікетидсинтазою (ПКС1): до початкових одиниць приєднуються 5 пропіонатних і 7 ацетатних залишків [271].

На третьому етапі продуктом експресії гена *aveE* — цитохромом $p450$ (транскрибується разом з *aveA3* і *aveA4*) утворюється фуранове кільце C_6 — C_8 . Продукт гена *aveF* має НАД(Ф)Н-зв'язувальну ділянку на N-кінці; *aveF*-мутанти продукують 5-оксо-

авермектини; це дає підстави припустити, що даний білок відновлює C_5 -кетогрупу. Продукт гена *aveD* метилює вуглець у положенні C_5 , донором метильної групи є S-аденозилметіонін. Інактивація *aveD* супроводжувалась відсутністю кеторедукції у положенні C_5 , що вказує на розташування згаданих генів у спільній одиниці транскрипції.

На четвертому етапі біосинтезу авермектинів діють продукти генів *aveB1* — *B8*, які забезпечують синтез олеандрози (*aveB2* — *B8*) та приєднання її до аглікону (продукту гена *aveB1* — глікозилтрансфераза) [271].

Таким чином, біосинтез авермектинів є досить складним процесом, що потребує належного генетичного і метаболічного забезпечення та регуляції.

1.4.2. Вплив умов культивування на синтез авермектинів *Streptomyces avermitilis*

Відомо, що умови культивування мікроорганізмів відіграють надзвичайно важливу роль у синтезі ними біологічно важливих сполук. Багаторічні дослідження закономірностей біосинтезу вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків, засвідчують роль макро- і мікроелементів живлення. Джерело вуглецю, співвідношення вуглець : азот і наявність мінеральних сполук у середовищі культивування можуть позитивно чи негативно впливати на процес біосинтезу антибіотиків, зокрема авермектинів. Слід також зазначити, що селекціоновано декілька штамів *Streptomyces avermitilis* — продуцентів авермектинів: МА-4680^T [73], ATCC31267/ATCC31780 [268], С-18 [184], ВНИИСХМ-54[49]. Умови культивування кожного з продуцентів мають свої специфічні особливості й потребують спеціальних досліджень. В Україні отримано декілька штамів, здатних продукувати авермектини. З чорноземного ґрунту Житомирської області (Попельнянський район) співробітниками відділу загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України виділено та депоновано в Українській колекції мікроорганізмів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2161 [50].

Характеристика штамів *Streptomyces avermitilis* — продуцентів авермектинів. Багатоступеневою селекцією з використанням спонтанної мінливості, мутагенезу ультрафіолетовими променями, N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном і рифампіцином отримано продуценти *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 і *S. avermitilis* УКМ 2179 з

рівнем накопичення авермектинів 1000—1800 мкг/мл [27, 28, 51]. Ці штами в цілому зберегли усі типові ознаки природного штаму УКМ Ас-2161. Основні з них наведено нижче.

Мікроморфологічні ознаки. В умовах поверхневого вирощування на агаризованих середовищах (рН 6,8—7,4; температура 28 °С) стрептоміцети утворюють спорофори у вигляді невеликих спіралей (до 3—5 завитків), які при суцільному рості з віком розташовуються так тісно, що мають вигляд клубочків. Оболонка спор гладка.

Макроморфологічні ознаки. За тих самих умов росту протягом перших 7 діб окремі колонії плоскі на вигляд і зазвичай мають невеликі розміри (3—5 мм діаметром, іноді й менше); з віком (7—14 діб) діаметр колоній збільшується до 1 см. У центрі колоній з'являється підвищення, на схилах якого можна спостерігати більш-менш виразну складчастість. У разі суцільного росту складчастість або горбистість проявляється лише по краях росту.

Культуральні ознаки. На глюкозо-картопляному агарі стрептоміцети ростуть добре. Субстратний міцелій з віком змінює колір від буруватого до темно-коричневого з червонуватим відтінком. Повітряний міцелій також добре розвинений, у 7-добовому віці він має білувато-сіре забарвлення з коричнюватим відтінком; у 14-добовому віці білий відтінок зникає, проте до забарвлення додається слабкий жовтуватий відтінок. Розчинний пігмент відсутній.

Фізіолого-біохімічні властивості материнського штаму *S. avermitilis* УКМ Ас-2161 і селекціонованого *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 наведено у табл. 1.29. Як засвідчують наведені дані, різниця між штамми полягає у їх відношенні до джерел вуглецю і до антибіотиків. Крім того, *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 втратив здатність до пептонізації молока і трохи послабив активність засвоєння желатину і крохмалю.

Уперше середовище для культивування продуцента авермектинів було описане W.R. Burg у 1979 р. [73]. Найбільший вихід авермектинів у різних штамів *S. avermitilis* спостерігається при вирощуванні на середовищах, що містять як джерела вуглецю, азоту та поживних речовин спиртову барду, пептонізоване молоко і дріжджовий автолізат.

Як основні джерела вуглецю застосовують глюкозу, манозу, декстрин-600, кукурудзяний крохмаль. Менш придатними для культивування *S. avermitilis* виявилися гліцерин, меляса, сахароза,

Таблиця 1.29

Фізіолого-біохімічні властивості *S. avermitilis* УКМ Ac-2179 і Ac-2161

Показник	<i>S. avermitilis</i> УКМ Ac-2179	<i>S. avermitilis</i> УКМ Ac-2161
Утилізація джерел вуглецю	Добре росте на глюкозі, рамнозі, сахарозі, маніті, інозиті, сорбіті; не росте на арабінозі, ксилозі, фруктозі, целюлозі	Добре росте на глюкозі, арабінозі, ксилозі, рафінозі; слабо росте на рамнозі, сахарозі, інозиті; не росте на фруктозі, маніті, целюлозі
Утворення меланіну	Утворює	Утворює
Розрідження желатину	Розріджує частково	Розріджує добре
Пептонізація молока	Не пептонізує	Пептонізує середньо
Коагуляція молока	Не коагулює	Не коагулює
Гідроліз крохмалю	Гідролізує частково	Гідролізує добре
Відновлення нітратів	Відновлює до аміаку	Відновлює до аміаку
Утворення H ₂ S	Не утворює	Не утворює
Руйнування клітковини	Не руйнує	Не руйнує
Відношення до антибіотиків	Чутливий до еритроміцину, неоміцину, гентаміцину, канаміцину і ампіциліну; слабкочутливий до тетрацикліну	Чутливий до еритроміцину, неоміцину, гентаміцину, канаміцину і тетрацикліну; не чутливий до ампіциліну

лактоза, інозит, рафіноза, ксилоза, глюкозамін [20, 73]. Замість спиртової барди можна також використовувати кукурудзяне, вівсяне, бавовняне, соєве чи арахісове борошно. Як джерела поживних речовин використовують також пептон, соєве молоко, яєчний порошок. Обов'язковим компонентом повноцінного середовища є дріжджовий автолізат (концентрація 0,25 %) як джерело вітамінів [163].

Найкращим джерелом вуглецю для синтезу авермектинів штамми *S. avermitilis* MA-4680^T (NRRL 8165 = ATCC 31271) та MA-4848 (його УФ-мутант ауксотрофний за триптофаном) було визнано глюкозу, а джерелом азоту — пептонізоване молоко [73]. З 12 вітамінів лише біотин стимулював синтез авермектинів у обох штамів, у зв'язку з чим обов'язковим компонентом ферментаційного середовища визнано дріжджовий автолізат як природне джерело вітамінів, зокрема біотину. З 18 перевірених амінокислот лише *D,L*-триптофан (0,5 мг/мл) і, можливо, *D,L*-метіонін (2,5 мг/мл) стимулювали синтез авермектинів штамом

Таблиця 1.30

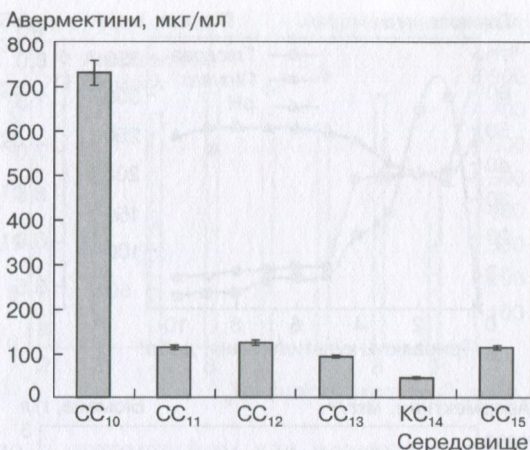
Рідкі середовища для вирощування *S. avermitilis* УКМ Ас-2177

Вид середовища	Склад середовища, г/л	Літературне джерело
Соєве середовище		
СС _м	Соєве борошно — 15; сухі дріжджі — 5; глюкоза — 20	[50]
СС ₁₀	Соєве борошно — 16; сухі дріжджі — 4; кукурудзяний екстракт — 4,8 мл; СаСО ₃ — 4; К ₂ НРО ₄ — 1; крохмаль — 23; глюкоза — 70	Модифіковано нами
СС ₁₁	Соєве борошно — 12; сухі дріжджі — 6; СаСО ₃ — 6; кукурудзяний екстракт — 3; глюкоза — 30	[44]
СС ₁₂	Соєве борошно — 14; дріжджовий екстракт — 2,5; NaCl — 1; глюкоза — 45	[44]
СС ₁₃	Соєве борошно — 12; сухі дріжджі — 5; кукурудзяний екстракт — 3; СаСО ₃ — 4,5; К ₂ НРО ₄ — 0,5; глюкоза — 60	[49]
СС ₁₅	Соєве борошно — 12; дріжджовий автолізат — 4; кукурудзяний екстракт — 3; СаСО ₃ — 4,5; К ₂ НРО ₄ — 0,5; глюкоза — 50	Модифіковано нами
Картопляне середовище		
КС ₁₄	Відвар 200 г картоплі в 1 л води; СаСО ₃ — 3; MgSO ₄ — 0,2; глюкоза — 20	[50]

МА-4680. Пригнічували синтез авермектинів КН₂РО₄ (0,5 мг/мл) та MgSO₄ (0,25 мг/мл); водночас NaCl (1 мг/мл) не впливав на цей процес. Додавання до комплексного ферментаційного середовища полігліколю Р-2000 (2,5 мл/л) приводило до помітного підвищення синтезу авермектинів — з 17 до 53 мкг/мл. У комплексі авермектинів, продукованих МА-4680 (дикий штам) та МА-4848 (його УФ-мутант), співвідношення компонентів залишалось у певних межах: А₁ — 10—15 %, А₂ і В₁ — по 30—40 % загальної продукції авермектинів [73].

Для виявлення потенційної авермектинсинтезуючої здатності селекціонованого активного штаму *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 було проведено дослідження з визначення середовищ, на яких авермектинсинтезуюча здатність продуценту виявлялась найбільшою мірою.

Рис. 1.13. Накопичення авермектинів *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 на різних середовищах (склад середовищ наведено у табл. 1.30)



Накопичувальну культуру вирощували на соєвому середовищі (СС_м). Для культивування було використано ферментаційні середовища на основі соєвого борошна та картопляного відвару (СС₁₀, СС₁₁, СС₁₂, СС₁₃, КС₁₄, СС₁₅), які мали співвідношення С : N від 9,6 до 30 (табл. 1.30).

Найвищу авермектинсинтезуючу здатність штам виявляв на середовищі СС₁₀, де співвідношення С/N було найбільшим, що є одним із основних факторів біосинтезу авермектину. Накопичення авермектинів у цьому середовищі становило 729 мкг/мл (рис. 1.13).

Відомо, що антибіотики переважно є вторинними метаболітами, синтез яких починається наприкінці логарифмічної — на початку стаціонарної фази. За даними літератури, синтез авермектинів у *S. avermitilis* припадає на 7-му добу у стаціонарній фазі росту. Проте кожний продуцент має певні відмінності у динаміці синтезу антибіотика.

У наших дослідах у перебігу культивування *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 на синтетичному середовищі на початку культивування (1-ша доба) штам інтенсивно споживав глюкозу — її вміст зменшувався майже на 50 % щодо початкового (рис. 1.14, а), при цьому рН знижувався до 6,4. Це можна пояснити тим, що одночасно зі швидким споживанням глюкози утворюються органічні кислоти, які екскретуються в середовище культивування. Вже на 1-шу добу вирощування в культуральній рідині було виявлено піруват (272 мг/мл), вміст якого зменшувався в процесі подальшого культивування, що супроводжувалось підвищенням

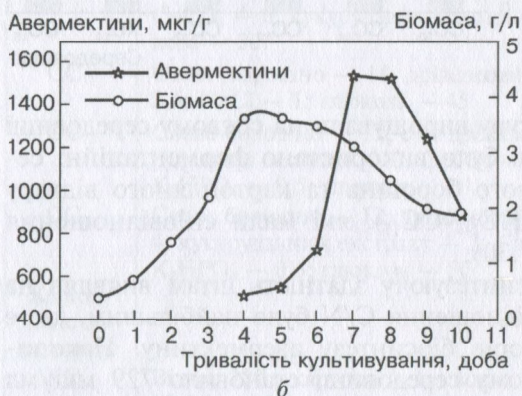


Рис. 1.14. Зміни рН, вмісту глюкози і пірувату (а), накопичення авермектинів та біомаси (б) у процесі культивування *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 на синтетичному середовищі

рН середовища до 7,0 та інтенсивним накопиченням біомаси (рис. 1.14, б).

Виявлено, що ріст штаму *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 дещо відрізнявся від такого відомих інших штамів-продуцентів авермектину [10]. Відбувалося інтенсивне засвоєння глюкози протягом 1-ї доби культивування, у той час як у інших продуцентів цей процес фіксувався між 2-ю та 3-ю добою.

Оптимальним значенням рН для продукування антибіотика виявилось 7,0, що дещо відрізняється від літературних даних про оптимум рН 7,2–7,5 [3]. Ці відмінності можна пояснити фізіологічними особливостями штаму *S. avermitilis* УКМ Ас-2179.

Зростання рН культуральної рідини зумовлене, імовірно, споживанням пірувату та виділенням вторинних продуктів метаболізму. Наприкінці 3-ї доби за інтенсивного споживання глюкози значно зростала біомаса *S. avermitilis* УКМ Ас-2179, пі-

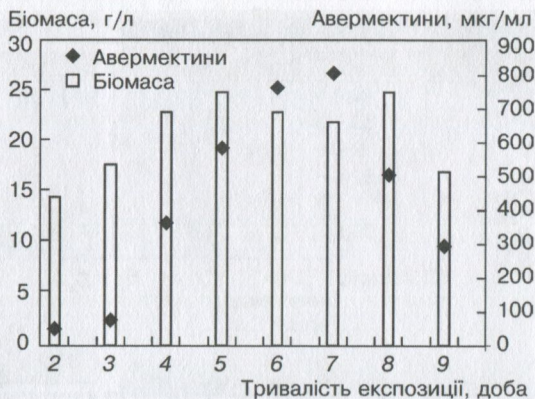


Рис. 1.15. Динаміка накопичення біомаси і авермектинів *S. avermitilis* UKM Ac-2177:

2–4 — експоненційна фаза росту; 5–7 — стаціонарна фаза росту; 8, 9 — фаза відмирання

вень рН становив 7,0, що є оптимальним для початку синтезу авермектинів.

З 6-ї доби починався інтенсивний синтез авермектину (рис. 1.14, б) і сягав максимуму (1535 мкг/г сухої біомаси) на 7-му добу культивування. При цьому максимальне накопичення біомаси становило 3,6 г/л. Вміст глюкози та пірувату в середовищі інтенсивно зменшувався; рН середовища не змінювався.

Подібні результати щодо динаміки росту і накопичення авермектину отримано у дослідях із *S. avermitilis* UKM Ac-2177 при вирощуванні на повноцінному соєвому середовищі CC_{10} .

Максимальну активність синтезу авермектину спостерігали наприкінці стаціонарної фази росту, коли загальний вміст авермектинів становив 801 мкг/мл, при цьому біомаса не збільшувалась (рис. 1.15).

Важливо також було визначати, як змінюється компонентний склад авермектину впродовж культивування. У період росту стрептоміцета-продуцента на середовищі CC_{10} в якісному складі авермектинового комплексу відбувалися певні зміни: протягом 2–4 діб культивування спостерігали наявність лише однієї фракції — A_1 (рис. 1.16). При подальшому культивуванні, у стаціонарну фазу росту культури реєстрували появу фракцій A_2 та B_1 (5–9-та доба). На 7-му добу реєструвалася найбільша кількість фракції B_1 , у подальшому, зі зменшенням активності синтезу авермектину, зменшувався і вміст фракції B_1 . Отже, для отримання авермектину з найбільшим вмістом фракції B_1 доцільно екстрагувати антибіотик з біомаси *S. avermitilis* на 7-му добу культивування. Саме тоді фракція B_1 , що характеризується найбільшою антипарази-

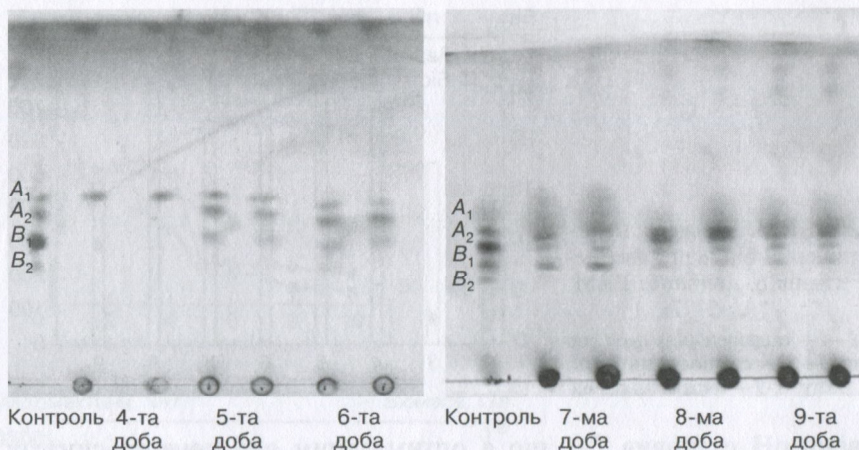


Рис. 1.16. Компонентний склад фракцій авермектинового комплексу *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 протягом культивування з 4-ї по 9-ту добу (тонкошарова хроматографія)

тарною активністю, виявляється у складі комплексу в найвищій концентрації.

Важливе значення у синтезі авермектинів має вміст джерел вуглецевого живлення в середовищі. Більшість дослідників особливо увагу приділяють глюкозі, наявність якої у живильному середовищі забезпечує накопичення біомаси продуцента й активізує утворення антибіотика завдяки збільшенню у пентозофосфатному циклі кількості відновлених еквівалентів НАДФ · Н, необхідних для синтезу авермектину [115]. Низький вміст глюкози у середовищі культивування лімітує метаболізм клітини за вуглецем, зменшуючи співвідношення вуглецю і азоту у середовищі і збільшуючи включення вуглецю в азотовмісні сполуки, а не в безазотні метаболіти, зокрема авермектини [20, 115]. На середовищах з різним вмістом глюкози (від 1 до 7 %) кількість авермектину поступово зростає разом зі збільшенням біомаси продуцента *S. avermitilis* ВКМ Ас1301. Обидва показники були максимальними в середовищі з 7 % глюкози — 400 мг авермектину в 1 г сухої маси міцелію і 26,4 г біомаси в 1 л середовища. За наявності 10 % глюкози спостерігалось різке зниження обох показників [20]. Введення до середовища декстрину або крохмалю не сприяло збільшенню виходу антибіотика [44].

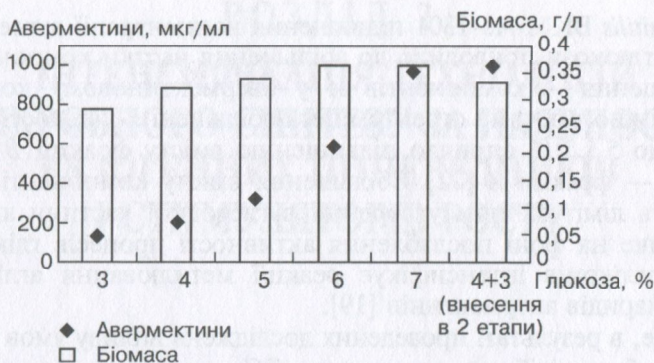


Рис. 1.17. Накопичення авермектинів та біомаси *S. avermitilis* УКМ Ас-2161 на 7-му добу росту за різних концентрацій глюкози у живильному середовищі

Додавання глюкози до середовища у декілька прийомів: по 1 % на 4, 5 і 6-ту доби культивування збільшувало як загальне продукування авермектину, так і вміст в ньому фракції B_1 (останній зростав у 2,2 раза порівняно з контролем) [268].

На соєвому середовищі CC_{10} нами вивчено синтез авермектинів за різних концентрацій і строків внесення глюкози у середовище для культивування *S. avermitilis* УКМ Ас-2177. Вміст глюкози в середовищах варіював від 3 до 7 %, також проводили досліди з внесенням глюкози у два етапи: 4 % на початку культивування і 3 % на 3-тю добу росту, при цьому значення $C : N$ у середовищі змінювалося від 19 до 30. Рівень накопичення авермектинів визначали у стаціонарній фазі росту (на 7-му і 14-ту добу культивування).

Найбільшу кількість авермектинів (970 мкг/мл) культура *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 синтезувала на 7-му добу росту, якщо на початку культивування вносили 7 % глюкози (рис. 1.17). За умов внесення глюкози в середовище у два етапи (4 % глюкози на початку + 3 % на 3-тю добу росту) найвищий вміст авермектинів спостерігався значно пізніше — на 14-ту добу росту. При цьому кількість синтезованого авермектинового комплексу була на 4 % більшою порівняно з внесенням глюкози у такий самій кількості на початку культивування і становила 1005 мкг/мл.

Підвищення концентрації глюкози у середовищі зазвичай приводить до зростання вмісту компонентів B і зменшення частки компонентів A у складі авермектинового комплексу. У штаму

S. avermitilis ВКМ Ас-1301 підвищення концентрації вуглеводу до 5 і 7 % глюкози приводило до збільшення частки компонентів *B* і зменшення — компонентів *A* у авермектиновому комплексі [12]. В іншого штаму стрептоміцета збільшення кількості глюкози з 2 до 5 і 7 % сприяло підвищенню вмісту фракції *B* і зменшенню — фракції *A* [22]. Збільшення вмісту компонентів *A* пояснюють лімітуванням утворення вуглеводної частини авермектинів, яке на фоні послаблення активності процесів глікозилювання агліконів інтенсифікує реакції метилювання агліконів і моносахаридів авермектинів [19].

Отже, в результаті проведених досліджень впливу умов культивування було відібрано середовище CC_{10} як найсприятливіше для продукування авермектинового комплексу *S. avermitilis*. Найкраще авермектини *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 продукуються на соєвому середовищі, яке містить 7 % глюкози. Показано, що синтез антипаразитарної фракції B_1 починається на початку стаціонарної фази росту (на 5-ту добу вирощування), сягає максимальної кількості на 7-му добу (експоненційна фаза) та знижується при подальшому культивуванні. Оскільки найвищу активність культура *S. avermitilis* УКМ Ас-2177 виявляла на 7-му добу росту, це є найкращий період для отримання авермектинових екстрактів.