

*Т.П. Пирог<sup>\*</sup>, Н.В. Лащук<sup>\*</sup>, Ю.В. Корж<sup>\*\*</sup>*

<sup>\*</sup> Національний університет харчових технологій

вул.Володимирська, 68, Київ, 01033, Україна

<sup>\*\*</sup> Інститут мікробіології і вірусології НАН України

вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

## **РЕГУЛЯЦІЯ С<sub>2</sub>-МЕТАБОЛІЗМУ В УМОВАХ МІКСОТРОФНОГО РОСТУ *ACINETOBACTER* SP. УКМ В-7005 НА СУМІШІ ЕТАНОЛУ І ГЛЮКОЗИ**

Показана можливість усунення лімітування С<sub>2</sub>-метаболізму при вирощуванні *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 - продуцента екзополісахариду (ЕПС) етаполану на суміші етанолу і глюкози.

Культивування бактерій на незабуференому середовищі з етанолом і глюкозою супроводжувалось зниженням рН до 5,6-4,7, зумовлене накопиченням ацетату (25-45 мМ), зниженням концентрації біомаси і ЕПС.

Зменшення вмісту нітратно-амонійного джерела азоту у середовищі до 0,3 г/л і заміна його на нітратне, підвищення концентрації пантотенату кальцію до 0,0009%, катіонів калію і магнію до 100 і 5-10 мМ відповідно, використання посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті або етанолі, зниження початкової концентрації етанолу і глюкози до 0,25-0,5 % з наступним дробним їх внесенням порціями по 0,25% у процесі культивування бактерій дало змогу попередити накопичення ацетату в культуральній рідині і реалізувати без зниження показників синтезу етаполану на незабуференому середовищі.

**Ключові слова:** екзополісахариди, біосинтез, етаполан, міксотрофний ріст, суміш С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів, регуляція С<sub>2</sub>-метаболізму, умови культивування.

Штам *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 є продуцентом комплексного полісахаридного препарату (ЕПС) етаполану [1]. Етаполан складається з нейтрального і двох кислих компонентів, один з яких ацильований. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид вміщує жирні кислоти (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) [5].

Етаполан є полісахаридом мультифункціонального призначення і може бути використаний у нафтовидобувній, харчовій, хімічній промисловості як загущувальний, стабілізуювальний, емульгуювальний і суспендувальний агент [1, 5].

Попередні дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу етаполану на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів (глюкоза + етанол) [9, 11]. На основі аналізу шляхів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму у *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 [7, 8] і згідно з енергетичною класифікацією субстратів Бабеля [12] етанол класифікується як енергетично надлишковий, а глюкоза – як енергетично дефіцитний субстрати. У результаті теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу етаполану та біомаси штамом В-7005 встановлено співвідношення концентрацій етанолу та глюкози, що дозволяє уникнути непродуктивних втрат вуглецю та енергії, які мають місце при використанні моносубстратів та підвищити ефективність конверсії вуглецю субстратів у ЕПС. Введення етанолу в середовище з глюкозою у молярному співвідношенні 3,1:1 дало змогу збільшити кількість синтезованого етаполану в 1,8-1,9 разів, його вихід по відношенню до біомаси в 1,4-1,7 разів, а вихід від субстрату в 1,5-2 рази у порівнянні з вирощуванням бактерій на моносубстратах [9, 11]. Встановлено, що при культивуванні продуцента етаполану на суміші етанолу та глюкози обидва субстрати споживаються одночасно, при цьому підвищується в 1,3-1,4 раза

максимальна питома швидкість росту і скорочується у 4-6 разів час її досягнення.

Проте недоліком розробленої технології одержання етаполану є необхідність підтримання нейтрального значення рН у процесі культивування продуцента, що досягалось введенням у середовище високої концентрації солей (11 г/л) для створення достатньо ємного фосфатного буфера (0,05 М). При вирощуванні *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на незабуференому середовищі з етанолом і глюкозою спостерігалось зниження рН до 4-5, припинення росту бактерій і синтезу ЕПС.

Мета даної роботи – встановлення причин лімітування метаболізму при вирощуванні *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів, розробка підходів до їх усунення і реалізація процесу синтезу етаполану в умовах міксотрофного росту продуцента на незабуференому середовищі.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

**Об'єкти досліджень.** Як об'єкти досліджень використовували ЕПС-синтезувальний штам бактерій *Acinetobacter* sp. 12S [1], депонований в Українській колекції мікроорганізмів під номером В-7005, а також мутант штаму *Acinetobacter* sp. В-7005, що не синтезує ЕПС і який був одержаний за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу з вихідного штаму [6]. ЕПС-мутант штаму В-7005 названий *Acinetobacter* sp. В-7005 (1 НГ).

**Культивування бактерій.** Культивування здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8-7,0 упродовж 16-96 год на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л) **Середовище 1:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> - 6,8; КОН - 1,8; КСІ - 1,4; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 0,6; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,4; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O - 0,1; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,001. **Середовище 2:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> - 3,4; КОН - 0,9; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 0,6; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,4; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O - 0,1; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,001. Характеристика середовищ 1 і 2 наведена у табл.1.

Таблиця 1

**Характеристика середовищ для вирощування *Acinetobacter* sp.В-7005**

Середовище	Загальний вміст солей, г/л	Молярність буферу, М	Концентрація $K^+$ , мМ	Концентрація $Mg^{2+}$ , мМ
1	11,1	0,05	100	1,6
2	5,4	0,025	35	1,6

У середовища додатково вносили 0,5% (за об'ємом) дріжджового автолізату та 0,0006 або 0,0009 % пантотенату кальцію. Штами *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 і В-7005 (1НГ) є ауксотрофами за вітаміном В<sub>5</sub>.

При дослідженні впливу концентрації азоту на утворення ЕПС вміст NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> становив 0,3; 0,45 та 0,6 г/л. В одному з варіантів досліду нітрат амонію (0,3 г/л) у середовищі 2 був замінений на еквімолярну за азотом концентрацію KNO<sub>3</sub>, а концентрацію катіонів калію і магнію підвищували до 100 і 5-10 мМ відповідно. Катіони магнію і калію вносили у середовище 2 у вигляді 10%-ного розчину MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O і 20%-ного розчину KCl.

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол в концентрації 1,7 % (за об'ємом), глюкозу в концентрації 1,35 % (мас.), а також суміш цих субстратів у співвідношенні 1:1 (0,75 % етанолу за об'ємом : 0,75 мас. % глюкози). Вміст моносубстратів у середовищах був еквімолярним за вуглецем концентрації змішаного субстрату.

В одному з варіантів досліду початкова концентрація етанолу в середовищі становила 0,25 і 0,5 % (за об'ємом), глюкози - 0,25 і 0,5 % (мас.). Кожні 24 год здійснювали дробне внесення субстратів (по 0,25 % етанолу і 0,25 % глюкози) до кінцевої їх концентрації 0,75 %.

Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на МПА, а також культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищах 1 або 2. Як джерело вуглецю і енергії при одержанні посівного матеріалу використовували етанол 0,5% (за об'ємом) у присутності або відсутності ацетату натрію (0,1 мас.%), а також ацетат натрію 0,7 мас.%. Такий вміст ацетату є еквімолярним за вуглецем концентрації етанолу 0,5 % (за об'ємом). Ацетат натрію вносили у середовище у вигляді 20%-ного розчину. Концентрація інокуляту становила 5 % від об'єму середовища.

**Визначення параметрів росту і синтезу ЕПС.** Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком.

Ефективність трансформації вуглецю субстратів у ЕПС оцінювали за наступними показниками: кількість синтезованих ЕПС, вихід ЕПС від субстрату, ЕПС-синтезувальна здатність. Кількість синтезованих полісахаридів встановлювали ваговим методом [26] та за концентрацією вуглеводів, що визначались колориметричним методом за реакцією з фенолом і сірчаною кислотою [18]. ЕПС-синтезувальну здатність встановлювали як відношення кількості синтезованих ЕПС до біомаси та виражали в г ЕПС/ г АСБ.

Вихід ЕПС від субстрату визначали за формулою:

$$Y = \frac{P_t - P_o}{S_o - S_t} \times 100 \%,$$

де  $P_o$  і  $S_o$  - початкова концентрація ЕПС і субстрату, відповідно;  $P_t$  і  $S_t$  - концентрація ЕПС і субстрату на момент часу  $t$ , відповідно.

Концентрацію етанолу в культуральній рідині визначали за методом газо-рідинної хроматографії на хроматографі “Цвет-4” з полум’яно-іонізаційним детектором (колонка 2 м, твердий носій целіт-545, нерухома рідка фаза поліетиленгліколь ПЕГ-400 (20%), газ-носій - гелій, температура 150<sup>0</sup> С).

Концентрацію глюкози визначали за глюкозооксидазним методом [4].

Концентрацію пірувату в культуральній рідині визначали за методом, описаном у роботі [25], концентрацію ацетату – ензиматичним методом з використанням ацетаткінази [2].

**Одержання безклітинних екстрактів.** При одержанні безклітинних екстрактів *Acinetobacter* sp. В-7005 здійснювали попередню ультразвукову (УЗ) обробку культуральної рідини, що містить бактеріальні клітини та ЕПС. Застосування такого прийому зумовлене тим, що високов’язкий етаполан з високою молекулярною масою практично неможливо відокремити від клітин м’якими методами.

Культуральну рідину (експоненційна фаза росту) обробляли УЗ (22 кГц) на апараті УЗДН-1 упродовж 60 с, після чого центрифугували (5000g, 10

хв, 4 °С). Осад клітин тричі відмивали від залишків середовища та ЕПС 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,0), центрифугуючи (5000g, 10 хв, 4 °С). Така УЗ-обробка культури приводить до розщеплення високомолекулярних ЕПС на низькомолекулярні фрагменти. При цьому істотно знижується в'язкість культуральної рідини, що дає можливість відокремити клітини від фрагментів ЕПС при центрифугуванні.

Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,0) та руйнували УЗ (22 кГц) 4 рази по 50 с при 4 °С. Дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 °С), осад відкидали, супернатант використовували як безклітинний екстракт.

**Ензиматичні аналізи.** Активність алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1), ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3) [13], визначали за відновленням НАД<sup>+</sup>, а ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.4) [20] – за відновленням НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм.

Активність ацетил-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.1) [14] аналізували за утворенням ацетил-КоА, що вступає у реакцію з гідроксиламіном з утворенням ацетилгідроксамату. Продукт реакції ацетилгідроксамату з хлорним залізом визначали спектрофотометрично при 540 нм.

Активність ацетаткінази (КФ 2.7.2.1) [24] визначали за утворенням ацетилфосфату, який при взаємодії з гідроксиламіном утворює ацетилгідроксамат.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) [17] встановлювали за швидкістю утворення, а малатсинтази (КФ 4.1.3.2) [23] – за швидкістю поглинання фенілгідразону гліюксилату при 324 нм.

Активність ферментів визначали при температурі 28-30° С, оптимальній для росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005, та виражали у нмоль/(хв мг білка). Вміст білка в безклітинних екстрактах визначали за Bradford [15].

**Визначення швидкості окиснення субстратів інтактними клітинами.** Швидкість окиснення етанолу, ацетальдегіду, ацетату калію, глюкози та піровиноградної кислоти (ПВК) інтактними клітинами штаму *Acinetobacter* sp. B-7005 (1 НГ) (швидкість дихання інтактних клітин у присутності субстратів) встановлювали за швидкістю поглинання кисню у реакційній суміші полярографічним методом за допомогою електроду закритого типу на полярографі ППТ-1 при температурі 28-30 °С. Питому швидкість поглинання кисню виражали у нмоль O<sub>2</sub>/(хв мг клітин). Концентрація субстратів становила 10 мМ.

Для визначення швидкості дихання клітини *Acinetobacter* sp. B-7005 (1НГ) після культивування на суміші етанолу і глюкози (16-18 год, експоненційна фаза росту), центрифугували (4000 g, 15 хв, 4 °С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатним буфером (рН 7,0) центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували у 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатному буфері (рН 7,0). Для інкубації клітин при визначенні швидкості окислення субстратів використовували трис-НСІ буфер (0,05 М, рН 7,0).

Для визначення швидкості дихання штаму *Acinetobacter* sp. B-7005 (1НГ) культивували на середовищі 2 з етанолом і глюкозою. При цьому концентрація етанолу становила 0,25; 0,5 і 0,75 % (за об'ємом), глюкози - 0,25; 0,5 і 0,75 % (мас.).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакінім [3]. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно з t-критерієм Стьюдента при 5%-му рівні значимості.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередні ензиматичні дослідження штаму *Acinetobacter* sp. B-7005 показали, що С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-метаболізм у цих бактерій лімітований коензимом А [7, 8]. Так, при вирощуванні продуцента етаполану на середовищі з глюкозою або етанолом без пантотенату кальцію (попередника коензиму А) спостерігали зниження рН культуральної рідини, зумовлене накопиченням пірувату (40-50 мМ) або ацетату (50-65 мМ) відповідно. Накопичення ацетату мало місце також при культивуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 у присутності вітаміну В<sub>5</sub> на середовищі з етанолом, буферна ємність якого становила 0,025 М і нижче [10].

Дані, наведені у табл. 2, показують, що зменшення у два рази молярності буферу середовища при вирощуванні продуцента етаполану на суміші етанолу і глюкози супроводжувалось зниженням рН культуральної рідини, кількості синтезованих ЕПС, їх виходу по відношенню до субстрату і біомаси. Причому при використанні посівного матеріалу, вирощеного на МПА, показники синтезу ЕПС були нижчими, ніж у разі інокуляту, одержаного на етанолі. У наступних експериментах інокулят вирощували на середовищі з етанолом. Інші варіанти посівного матеріалу (зокрема, інокулят, вирощений на глюкозі або суміші етанолу і глюкози) у даній роботі не досліджували, оскільки раніше [9] було показано, що найвищі показники синтезу етаполану на середовищі 1 спостерігались при використанні посівного матеріалу, одержаного на середовищі з етанолом.

Встановлено, що зниження рН при культивуванні продуцента етаполану на середовищі 2 з етанолом і глюкозою зумовлене накопиченням ацетату (табл. 2). Піруват у культуральній рідині (КР) не був виявлений. Отже, в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. B-7005 на незабуференому середовищі має місце лімітування С<sub>2</sub>-метаболізму. Тому наші подальші дослідження були спрямовані на пошук факторів, які б дали змогу усунути лімітування метаболізму ацетату при вирощуванні бактерій на суміші етанолу і глюкози.

Таблиця 2

**Вплив умов культивування на синтез екзополісахариду етаполану на суміші етанолу (0,75 %) і глюкози (0,75%)**

Джерело вуглецю при одержанні інокуляту	Середовище культивування	Показники процесу						
		pH <sub>кін</sub>	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ	Вихід ЕПС від субстрату, %	Ацетат у КР, мМ	Піруват у КР, мМ
МПА	1	6,75	1,8	7,7	4,28	57,0	0	0
	2	4,70	1,1	3,2	2,90	23,7	45,0	0
Етанол, 0,5%	1	6,80	1,7	8,3	4,88	61,5	0	0
	2	5,60	1,2	4,2	3,50	31,1	24,5	0

Примітка. Кількість ЕПС, синтезованих на середовищах 1 і 2 з моносубстратами становила 3,5-4,5 г/л.

Відомо, що співвідношення концентрацій вуглецю та азоту у середовищі має суттєве значення для синтезу ЕПС [1]. Як правило, максимальний синтез ЕПС спостерігається в умовах ліміту за азотним джерелом живлення. Наші експерименти показали, що в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі 2 зниження концентрації азоту супроводжувалось незначним підвищенням кількості синтезованих ЕПС і їх виходу по відношенню до субстрату, проте спостерігалось підвищення у 1,5-2 рази ЕПС-синтезувальної здатності (табл. 3). Отже, “глибина лімітування” джерелом азоту є одним з факторів, що регулюють спрямованість біосинтетичних процесів у *Acinetobacter* sp. В-7005 у бік утворення ЕПС.

Попередні дослідження регуляції метаболізму ацетату при вирощуванні продуцента етаполану на етанолі показали, що активатором ацетил-КоА-синтетази у даних бактерій є пантотенова кислота [8, 10]. Результати, наведені у табл. 3, показують, що підвищення концентрації вітаміну В<sub>5</sub> у середовищі культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 до 0,0009% і зниження концентрації азотного джерела живлення до 0,3 г/л супроводжувалось збільшенням кількості синтезованих ЕПС і ЕПС-синтезувальної здатності у 1,2 і 1,9 разів відповідно. Проте у цьому разі вихід ЕПС від субстрату і рН підвищувались незначно, і в культуральній рідині був виявлений ацетат.

Проведені нами раніше дослідження швидкості дихання інтактних клітин *Acinetobacter* sp. В-7005, вирощених на етанолі, у присутності С<sub>2</sub>-субстратів, показали, що ацетат, на відміну від етанолу та ацетальдегіду, практично не окиснювався за рН 5,5-5,7, так само як і екзогенний ацетат, добавлений в експоненційній фазі росту бактерій на середовищі з етанолом, залучався до метаболізму за рН 6,7-6,8 і не асимілювався за рН 5,5 [10]. Тому ми припустили, що в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. В-7005 на суміші етанолу і глюкози можна підвищити рН і таким чином попередити накопичення ацетату в культуральній рідині шляхом заміни амонійно-

Таблиця 3

**Залежність синтезу етаполану на суміші етанолу (0,75%) і глюкози (0,75%) від концентрації у середовищі 2 джерела азотного живлення і пантотенату кальцію**

Концентрація $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , г/л	Концентрація $\text{B}_5$ , %	Показники процесу				
		pH кінцеве	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСБ	Вихід ЕПС від заданого субстрату, %
0,6	0,0006	5,60	1,2	4,2	3,50	31,1
	0,0009	5,80	1,4	4,6	3,29	34,1
0,45	0,0006	5,50	1,3	4,4	3,38	32,6
	0,0009	5,70	1,2	4,4	3,67	32,6
0,30	0,0006	5,45	0,85	4,6	5,41	34,1
	0,0009	5,80	0,75	5,0	6,67	37,0

Примітка. Посівний матеріал вирощений на середовищі 1 з 0,5% етанолу, 0,6 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  і 0,0006%  $\text{B}_5$ .

нітратного джерела азоту у середовищі культивування на нітратне, оскільки споживання бактеріями нітратного азоту супроводжується підвищенням рН. Дійсно, заміна  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,3 г/л) на еквімолярну за азотом концентрацію  $\text{KNO}_3$  супроводжувалась збільшенням показників синтезу ЕПС, при цьому спостерігали також підвищення рН культуральної рідини (табл. 4).

Лімітування метаболізму ацетату при вирощуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на суміші етанолу і глюкози може бути зумовлене двома причинами: інгібуванням активності ацетил-КоА-синтетази продуктами окиснення етанолу (НАДН і НАДФН), як показано нами раніше [10], а також інгібуванням синтезу цього ферменту глюкозою, як це встановлено для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і бактерій *Bacillus subtilis* [19, 21].

З літератури відомо, що ацетил-КоА-синтетаза, яка функціонує в клітинах багатьох про- та еукаріот, є індукцибельним ферментом, індуктором якого є ацетат [16, 22]. Таким чином, цілком ймовірно, що використання посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті або на етанолі в присутності ацетату, дасть змогу частково усунути лімітування  $\text{C}_2$ -метаболізму при вирощуванні бактерій на суміші етанолу і глюкози і, як наслідок, підвищити синтез етаполану на незабуференому середовищі.

Як видно з наведених у табл. 4 даних, застосування інокуляту, вирощеного на середовищі 1 з ацетатом або етанолом у присутності ацетату, супроводжувалось суттєвим підвищенням всіх показників синтезу ЕПС у порівнянні з інокулятом, одержаним на такому самому середовищі з етанолом. У разі вирощування посівного матеріалу на середовищі 2 показники синтезу ЕПС на суміші етанолу і глюкози були практично однаковими незалежно від джерела вуглецю при одержанні інокуляту, причому на середовищі з нітратом амонію ці показники були значно нижчими у порівнянні з використанням  $\text{KNO}_3$  (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив способу приготування посівного матеріалу і природи джерела азоту на синтез етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. B-7005 на суміші етанолу (0,75%) і глюкози (0,75%)**

Джерело вуглецю при одержанні інокуляту	Джерело азоту при одержанні інокуляту і культивуванні	Середовище при одержанні інокуляту	Показники процесу			
			pH кінцеве	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСБ	Вихід ЕПС від заданого субстрату, %
Етанол, 0,5%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	5,80	5,00	6,67	37,0
		2	5,0	4,90	6,30	36,3
	KNO <sub>3</sub>	1	6,60	5,70	6,57	42,2
		2	6,65	6,60	8,25	48,9
Етанол, 0,5% + ацетат натрію, 0,1%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	6,40	6,63	7,05	41,7
Ацетат натрію, 0,7%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	6,65	6,24	8,32	46,2
		2	6,15	5,20	6,50	38,5
	KNO <sub>3</sub>	1	6,80	6,40	8,53	47,4
		2	6,70	6,45	8,55	47,8

Примітки. 1. Культивування бактерій здійснювали на середовищі 2 з 0,0009% B<sub>5</sub>.

2. Концентрація нітрату калію еквімолярна за азотом 0,3 г/л нітрату амонію.

У табл. 5 наведено дані про вплив способу приготування посівного матеріалу на активність ключових ферментів  $C_2$ -метаболізму в умовах міксотрофного росту бактерій. При використанні інокуляту, вирощеного на ацетаті, спостерігали зниження більш, ніж у 3 рази активності алкогольдегідрогенази, у той час як активність ацетил-КоА-синтетази, ацетаткінази, ізоцитратліази і малатсинтази підвищувалась у 1,8-2 рази у порівнянні із застосуванням інокуляту, одержаного на етанолі. Отже, ензимологічні дослідження можуть свідчити про те, що використання посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті, дає змогу усунути лімітування метаболізму ацетату при культивуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 на незабуференому середовищі з етанолом і глюкозою. Проте слід зазначити, що ці висновки справедливі тільки у разі вирощування інокуляту на середовищі 1.

З практичної точки зору середовище 2 є привабливішим для одержання посівного матеріалу, ніж середовище 1, за двома причинами: по-перше, воно економічніше, оскільки концентрація солей у ньому вдвічі нижча; по-друге, у біотехнологічних процесах з метою скорочення тривалості лаг-фази для вирощування інокуляту і культивування продуцентів практично важливих метаболітів, як правило, використовують середовища однакового складу.

У зв'язку з цим наступний етап наших досліджень був присвячений встановленню умов культивування продуцента етаполану на незабуференому середовищі з етанолом і глюкозою, які б забезпечили високий рівень синтезу ЕПС при використанні посівного матеріалу, вирощеного на середовищі 2. У подальших експериментах інокулянт вирощували на середовищі 2 з 0,0009% пантотенату кальцію,  $KNO_3$  і етанолом.

Раніше нами було показано, що активаторами ацетил-КоА-синтетази у *Acinetobacter* sp. B-7005 є, крім пантотенової кислоти, катіони калію і магнію [10]. Так, максимальна активність цього ферменту у безклітинному екстракті спостерігалась за присутності 100 мМ  $K^+$  або 5-10 мМ  $Mg^{2+}$ . Результати

Таблиця 5

**Активність ключових ферментів C<sub>2</sub>-метаболізму при вирощуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 на суміші етанолу (0,75%) і глюкози (0,75%) залежно від способу приготування посівного матеріалу**

Ферменти	Активність (нмоль/(хв мг білка)) при використанні інокуляту, вирощеного на	
	етанолі	ацетаті натрію
НАД <sup>+</sup> -залежна алкогольдегідрогеназа	500,9	143,5
НАД <sup>+</sup> -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	157,2	142,3
НАДФ <sup>+</sup> -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	42,9	46,6
Ацетил-КоА-синтетаза	82,3	150,5
Ацетаткіназа	12,4	22,5
Ізоцитратліаза	9,2	19,2
Малатсинтаза	13,3	28,5

Примітки. 1. Культивування бактерій здійснювали на середовищі 2, посівний матеріал вирощений на середовищі 1.

2. Як джерело азоту використовували NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, концентрація В – 0,0009%.

досліджень, наведені у табл. 6, показують, що підвищення у середовищі культивування продуцента етаполану концентрації катіонів калію і магнію супроводжувалось збільшенням кількості синтезованих ЕПС на 20-27% і виходу ЕПС від субстрату в 1,3 рази (табл. 6), тобто практично до рівня, одержуваного в умовах міксотрофного росту родуцента етаполану на середовищі 1 з високою ємністю буферу – 8,3-9,2 г/л [9].

Ще одним підходом для інтенсифікації синтезу етаполану на суміші етанолу і глюкози може бути дробне внесення субстратів у середовище. На нашу думку, такий прийом дасть змогу, з однієї сторони, зменшити або усунути інгібувальну дію продуктів окиснення етанолу і ацетальдегіду на активність ацетил-КоА-синтетази, а з другої – частково зняти можливий репресуючий вплив глюкози на синтез цього ферменту. На користь цього припущення свідчили дані визначення швидкості дихання інтактних клітин у присутності  $C_2$ - $C_6$ -субстратів (табл. 7). Так, швидкість окиснення ацетату клітинами, вирощеними на середовищі з підвищеним вмістом глюкози і етанолу, була у 1,3-1,7 разів нижчою, ніж у клітин, які були вирощені за нижчої концентрації субстратів. При цьому швидкість дихання у присутності етанолу, ацетальдегіду, глюкози і ПВК була практично однаковою незалежно від концентрації етанолу і глюкози у середовищі культивування.

Зниження початкової концентрації субстратів у середовищі 2 до 0,5 і 0,25% (з наступним дробним внесенням порціями по 0,25% у процесі культивування бактерій) супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ЕПС і ЕПС-синтезувальної здатності (рисунок).

Таким чином, у результаті проведеної роботи підібрані умови культивування продуцента етаполану на суміші етанолу і глюкози, які дають змогу частково усунути лімітування  $C_2$ -метаболізму і реалізувати процес синтезу ЕПС на середовищі, молярність буферу якого знижена у два рази. Такими умовами є: зниження концентрації азоту і заміна нітратно-амонійного джерела азоту на нітратне, підвищення вмісту катіонів калію і

**Вплив різних концентрацій  $K^+$  і  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування на синтез етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp.В-7005 на суміші етанолу (0,75 %) і глюкози (0,75%)**

Концентрація $K^+$ , мМ	Концентрація $Mg^{2+}$ , мМ	Показники процесу		
		ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСБ	Вихід ЕПС від заданого субстрату, %
35	1,6	6,60	8,32	46,2
100	1,6	7,92	8,80	58,7
35	5	8,10	9,00	60,0
35	10	8,30	9,20	61,5
100	5	8,20	9,30	60,7
100	10	8,40	9,33	62,2

- Примітки. 1. Одержання посівного матеріалу і культивування бактерій здійснювали на середовищі 2 з 0,0009 %  $B_5$ ,  $KNO_3$  і етанолом.  
 2. У середовищі 2 концентрація  $K^+$  становить 35 мМ, а  $Mg^{2+}$  - 1,6 мМ.

Таблиця 7

**Швидкість дихання у присутності С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів інтактних клітин *Acinetobacter* sp. В-7005 (ІНГ), вирощених на суміші етанолу і глюкози**

Джерело вуглецевого живлення	Швидкість дихання (нмоль О <sub>2</sub> / хв мг клітин) у присутності				
	етанолу	ацеталь-дегіду	ацетату калію	глюкози	ПВК
Етанол, 0,25% + глюкоза, 0,25%	74,7	79,8	68,9	67,3	59,4
Етанол, 0,5% + глюкоза, 0,5%	71,6	78,4	52,5	66,7	58,3
Етанол, 0,75% + глюкоза, 0,75%	70,3	78,2	40,8	65,6	56,2

- Примітки. 1. Одежання посівного матеріалу і культивування бактерій здійснювали на середовищі 2 з 0,0009 % В<sub>5</sub> і КНО<sub>3</sub>.  
2. Як джерело вуглецю при одержанні інокуляту використовували етанол.

магнію у середовищі, використання посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті або етанолі, зниження початкової концентрації субстратів з наступним дробним їх внесенням у процесі культивування бактерій.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединениях. Киев: Наук. думка, 1992. – 212 с.
2. Криштаб Т.П., Соколов И.Г. Энзиматический метод количественного определения уксусной кислоты в культуральной жидкости // Микробиол. журнал. – 1985. – 47, N 1. – С. 86-88.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
4. Лукомская И.С., Городецкий В.К. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы крови в норме и при диабете // Биохимия. – 1961. – 26, N 3. – С. 477-482.
5. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp.: Автореф. дис... д-ра біол. наук. – Київ, 1999. – 450 с.
6. Пирог Т.П., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter* sp., не образующих экзополисахариды // Микробиология. – 2000. – 69, N 5. – С. 674-680.
7. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его C<sub>6</sub>-метаболизма // Микробиология. – 2002. – 71, № 2. – С 215-221.
8. Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р. Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Микробиология. – 2002. – 71, № 2. – С 222-229.

9. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. – 2003. – 72, № 1. – С. 26-32.
10. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл.биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, № 2. – С. 180-188.
11. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. – 2003. – 72, № 3. – С. 348-355.
12. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. – 1985. – 131, N 1. – P. 39-45.
13. Beardmore-Gray M., Anthony C. The absence of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* // J. Gen. Microbiol. – 1983. – 129, N 10. – P. 2979-2983
14. Beinert H., Green D.E., Hele P. et al. The acetate activating enzyme system of heart muscle // J. Biol. Chem. – 1953. – 203, N 1. – P. 35-45.
15. Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72, N 3. – P. 248-254.
16. De Virgilio C., Burckert N., Barth G. et al. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. – 1992. – V. 8, N 12. – P. 1043-1051.
17. Dixon G.H., Kornberg H.S. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle // Biochem. J. – 1959. – 72, N 1. – P. 195-196.
18. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. – 1956. – 28, N 3. – P. 350-356.

19. Hommel R., Kurth J., Klebel H.P. NADP<sup>+</sup>-dependent aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rancens* CCM 1774: purification and properties // J. Basic Microbiol. – 1988. – 28, N 1-2. – P. 25-33.
20. Grundy F.J., Turinsky A.J., Henkin T.M. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA // J. Bacteriol. – 1994. – 176, N 15. – P. 4527-4533.
21. Kratzer S., Schuller H.J. Carbon source-dependent regulation of acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACS1 from *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. – 1995. – 161, N 1. – P. 75-79.
22. Kumari S., Tishet R., Eisenbach M., Wolfe A.J. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177, N 10. – P. 2878-2886.
23. Pearce J., Carr N.G. The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans* // J. Gen. Microbiol. – 1967. – 49, N 2. – P. 301-313.
24. Rose I.A., Grunberg-Manago M., Korey S., Ochoa S. Enzymatic phosphorylation of acetate // J. Biol. Chem. – 1954. – 211, N 2. – P. 737-756.
25. Sloneker J.N., Orentas D.G. Pyruvic acid – a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide // Nature – 1962. – 194, N 4827. – P. 478-479.
26. Williams A.G., Wimpenny W.T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. – 1978. – 104, N 1. – P. 47 - 57.