

УДК 579.22

Т.П. Пирог, д-р біол. наук  
І.В. Білець, магістрант  
А.Д. Конон, асп.  
Національний університет  
харчових технологій

**СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ  
РЕЧОВИН ACINETOBACTER  
CALCOACETICUS K-4 НА СУМІШІ  
ЕНЕРГЕТИЧНО НЕРІВНОЦІННИХ  
РОСТОВИХ СУБСТРАТІВ**

Встановлено можливість інтенсифікації синтезу метаболітів з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (гліцерин, глюкоза, етанол) субстратів. Умовна концентрація поверхнево-активних речовин (ПАР) на суміші ростових субстратів підвищувалася у 1,2 — 4 рази порівняно з культивуванням штаму K-4 на моносубстратах. Найвищі показники синтезу ПАР на суміші гексадекану і етанолу, гексадекану і глюкози спостерігалися за використання інкуляту з відповідних змішаних субстратів, а на суміші гексадекану і гліцерину — у разі застосування посівного матеріалу, вирощеного на моносубстраті гексадекані.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, інтенсифікація біосинтезу, енергетично нерівноцінні ростові субстрати

---

Відомо, що культивування мікроорганізмів на суміші ростових субстратів дає змогу уникнути непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце за використання моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу та інтенсифікувати синтез вторинних метаболітів [2, 4]. В умовах міксотрофного росту мікроорганізмів підвищення рівня біомаси, швидкості росту, скорочення тривалості лаг-фази може бути зумовлене використанням одного з субстратів як додаткового джерела енергії; одночасним використанням субстратів у енергетичному та конструктивному метаболізмі; розширенням «вузьких місць» метаболізму моносубстрату за рахунок введення додаткового субстрату [2, 4].

У наших попередніх дослідженнях вперше встановлено можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану, продуцент *Acinetobacter* sp. IMB B-7005) на суміші енергетично нерівноцінних і енергетично дефіцитних ростових субстратів [2]. На основі експериментальних даних розроблено технологію одержання етаполану, що дала змогу підвищити у 2 рази максимальну швидкість росту продуцента, кількість синтезованого полісахариду, його вихід щодо біомаси та субстрату, а також скоротити тривалість культивування та покращити реологічні властивості розчинів етаполану, що визначають його практичну цінність.

Дотепер у літературі є небагато повідомлень про використання змішаних субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) [5, 6]. Так, наприклад, внесення глюкози (1 %) у середовище з шафрановою олією (4 %) під час культивування *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 — продуцента манозилеритритолліпідів дало змогу підвищити кількість синтезованих ПАР на 50 % [5]. Додаткове внесення гідрофобного субстрату (олія, гексадекан) у процесі вирощування продуцентів софороліпідів на середовищі з глюкозою також супроводжувалось підвищенням синтезу ПАР [6]. Слід зазначити, що у працях [5, 6] субстрати, що додатково вносяться у середовище на різних фазах росту продуцентів ПАР, автори називають «додатковими джерелами вуглецю» і не використовують термін «змішані субстрати».

© Т.П. Пирог, І.В. Білець, А.Д. Конон, 2012

Це дійсно так, оскільки з початку процесу і упродовж певного часу культивування мікроорганізмів здійснювали на середовищах з моносубстратами.

Штам *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує поверхнево-активні речовини за умов росту на гідрофільних (етанол) і гідрофобних (гексадекан) субстратах [1]. Зазначимо, що до недавнього часу у літературі була наявна інформація про синтез представниками роду *Acinetobacter* лише високомолекулярних біосурфактантів (комплекси позаклітинних полісахаридів і білків), яким притаманні емульгувальні, проте не поверхнево-активні властивості.

Встановлено можливість використання препаратів ПАР *A. calcoaceticus* K-4 у вигляді постферментаційної культуральної рідини для деструкції нафтових забруднень у воді та ґрунті. Суттєвою перевагою таких препаратів є відсутність стадій виділення та очищення ПАР, що дозволяє підвищити ефективність технології їх отримання. Крім того показано, що препаратам ПАР (стерильний супернатант культуральної рідини) штаму K-4 притаманні антимікробні властивості.

Оптимізація умов культивування *A. calcoaceticus* K-4 дала змогу підвищити показники синтезу ПАР у три рази [1, 2], а дослідження особливостей метаболізму *A. calcoaceticus* K-4 [3] — класифікувати етанол як енергетично дефіцитний субстрат. Згідно енергетичної класифікації субстратів Бабеля [4] гексадекан є енергетично надлишковим, а глюкоза і гліцерин — енергетично дефіцитними субстратами.

Мета даної роботи — дослідити можливість інтенсифікації поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів (гексадекан + глюкоза, гексадекан + гліцерин, гексадекан + етанол).

Штам *A. calcoaceticus* K-4 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером IMB B-7241.

Культивування *A. calcoaceticus* K-4 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,35;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{NaCl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14; рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів [1] — 0,1 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю та енергії використовували моносубстрати (гексадекан, етанол, глюкоза, гліцерин), а також суміш цих субстратів. Концентрації кожного з моносубстратів у змішаному субстраті становила 0,5 і 1,0 % (об'ємна частка у разі використання етанолу, гексадекану і гліцерину, масова частка — для глюкози). Моно- і змішані субстрати, використовувані для культивування штаму K-4, були еквімолярні за вуглецем.

Посівним матеріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* K-4 з експоненційної фази росту, вирощена на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами вуглецю у середовищі для одержання інокуляту були моносубстрати у концентрації 0,5 %, а також суміш субстратів (по 0,25 % кожного з моносубстратів). Концентрація посівного матеріалу ( $10^4$  —  $10^5$  клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) упродовж 120 год при 30°C.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР\*, індекс емульгування  $E_{24}$ ) визначали як описано у праці [1].

На першому етапі досліджували залежність синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів від способу підготовки посівного матеріалу (табл. 1).

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу ПАР на змішаних субстратах залежать від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту. Так, за використання посівного матеріалу, вирощеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР під час культивування штаму K-4 на суміші гексадекану і гліцерину була у 1,5 — 3,6 разів вищою, ніж на відповідних моносубстратах. У той же час найвищі показники синтезу ПАР на суміші гексадекану і глюкози, гексадекану

й етанолу (у 1,2 — 4,3 рази вищі порівняно з такими на монособстратах) спостерігалися у разі застосування інокуляту, вирощеного на відповідних змішаних субстратах (табл. 1).

*Таблиця 1.* Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез

Джерело вуглецю у середовищі для біосинтезу	Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Показники росту і синтезу ПАР		
		ПАР*	$E_{24}$ , %	Біомаса, г/л
Гексадекан, 0,5 % + + гліцерин, 0,5 %	Гексадекан, 0,5 %	4,0 ± 0,2	47 ± 2,3	1,2 ± 0,06
	Гліцерин, 0,5 %	2,7 ± 0,13	44 ± 2,2	0,9 ± 0,04
	Гексадекан, 0,25 % + + гліцерин, 0,25 %	2,2 ± 0,11	40 ± 2,0	1,25 ± 0,06
Гексадекан, 0,99 % Гліцерин, 1,02 %	Гексадекан, 0,5 %	2,7 ± 0,13	50 ± 2,5	1,8 ± 0,09
	Гліцерин, 0,5 %	1,1 ± 0,05	36,4 ± 1,8	0,9 ± 0,04
Гексадекан, 0,5 % + + глюкоза, 0,5 %	Гексадекан, 0,5 %	2,9 ± 0,14	48 ± 2,4	2,8 ± 0,14
	Глюкоза, 0,5 %	1,6 ± 0,08	20 ± 1,0	1,9 ± 0,1
Гексадекан, 0,25 % + + глюкоза, 0,25 %	Гексадекан, 0,25 % + + глюкоза, 0,25 %	3,2 ± 0,16	50 ± 2,5	1,9 ± 0,1
	Гексадекан, 0,5 %	2,6 ± 0,13	37,5 ± 1,9	1,6 ± 0,08
Гексадекан, 0,89 % Глюкоза, 1,14 %	Глюкоза, 0,5 %	0,75 ± 0,04	30 ± 1,5	0,75 ± 0,04
	Гексадекан, 0,5 %	2,5 ± 0,12	39,7 ± 1,9	1,8 ± 0,09
Гексадекан, 0,5 % + + етанол, 0,5 %	Етанол, 0,5 %	2,2 ± 0,11	32 ± 1,6	1,1 ± 0,05
	Гексадекан, 0,25 % + + етанол, 0,25 %	3,8 ± 0,19	40 ± 2,0	1,6 ± 0,08
	Гексадекан, 0,5 %	2,6 ± 0,13	37,5 ± 1,9	1,6 ± 0,08
Гексадекан, 0,89 % Етанол, 1,1 %	Етанол, 0,5 %	2,2 ± 0,11	35 ± 1,75	1,0 ± 0,05

*Примітка.* Концентрації змішаних і монособстратів еквімолярні за вуглецем. Концентрація глюкози наведена у % (масова частка), гексадекану, гліцерину та етанолу у % (об'ємна частка). Концентрація клітин в інокуляті становила ( $10^4$  —  $10^6$ )/мл.

Слід зазначити, що під час культивування *A. calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів не спостерігали суттєвого підвищення рівня біомаси порівняно з вирощуванням бактерій на монособстратах (табл. 1). Значення умовної концентрації поверхнево-активних речовин та індексу емульгування, одержані за умов росту штаму К-4 на змішаних субстратах свідчать про більш повну трансформацію вуглецю обох субстратів саме у цільовий продукт.

На наступному етапі досліджували синтез ПАР *A. calcoaceticus* К-4 залежно від концентрації монособстратів у суміші (табл. 2). У цих експериментах використовували інокулят, вирощений на середовищі з оптимальним джерелом вуглецю (див. табл. 1). Як і у разі нижчих концентрацій монособстратів у суміші, під час культивування штаму К-4 на вищих концентраціях змішаних субстратів спостерігали збільшення у 1,3 — 4 рази умовної концентрації ПАР порівняно з вирощуванням *A. calcoaceticus* К-4 на відповідних монособстратах (табл. 2). Проте показник ПАР\* за використання вищих концентрацій усіх досліджуваних субстратів виявився на 5 — 15 % меншим, ніж у процесі культивування бактерій на змішаних субстратах нижчої концентрації. Індекс емульгування культуральної рідини залишався практично незмінним за різних концентрацій монособстратів у суміші (39 — 40 % і 47 — 50 % на суміші гексадекану і етанолу, гексадекану і гліцерину відповідно) і тільки за умов росту штаму К-4 на змішаному субстраті з вищою концентрацією гексадекану і глюкози спостерігали збільшення показника  $E_{24}$  в 1,2 рази порівняно з використанням нижчих концентрацій цих субстратів (табл. 2).

## БИОТЕХНОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ

Таблиця 2. Синтез ПАР *A. calcoaceticus* K-4 на суміші гексадекану (1 %) з гліцерином (1 %), етанолом (1 %) і глюкозою (1%)

Субстрат	Показники росту і синтезу ПАР		
	ПАР*	$E_{24}$ , %	Біомаса, г/л
Гексадекан + гліцерин	3,8±0,19	50±2,5	1,5±0,07
Гексадекан, 1,98 %	2,7±0,13	50±2,5	1,5±0,07
Гліцерин, 2,04 %	0,9±0,04	32±1,6	0,7±0,03
Гексадекан + глюкоза	2,8±0,14	58±2,8	1,9±0,10
Гексадекан, 1,78 %	2,1±0,10	51±2,8	2,0±0,10
Глюкоза, 2,28 %	1,3±0,06	41±2,0	0,9±0,04
Гексадекан + етанол	3,4±0,17	39±1,9	2,0±0,10
Гексадекан, 1,8 %	2,1±0,10	51±2,8	2,0±0,10
Етанол, 2,2 %	2,7±0,13	32±1,6	2,0±0,10

Примітка. Під час культивування штаму K-4 на суміші гексадекану і глюкози, гексадекану і етанолу інокулянт вирощували на відповідних змішаних субстратах, за умов росту бактерій на суміші гексадекану і гліцерину посівний матеріал вирощений на гексадекані.

У табл. 3 наведено підсумкові дані щодо відносного збільшення (порівняно з моносубстратами) показників синтезу ПАР у процесі культивування штаму K-4 на змішаних субстратах різної концентрації. Аналіз даних, наведених у табл. 1 — 3, показує, що незважаючи на дещо більші абсолютні значення показника ПАР\* за нижчих концентрацій моносубстратів у суміші порівняно з вищими, чіткої кореляції між відсноною зміною показників синтезу ПАР на змішаних і відповідних моносубстратах різних концентрацій не встановлено. Так, наприклад, у процесі культивування штаму K-4 на суміші гексадекану (0,5 %) і гліцерину (0,5 %) показник ПАР\* збільшувався на 263 % від такого на моносубстраті гліцерині, а за підвищення концентрацій субстратів у суміші до 1,0 % — на 322 % (табл. 3). При цьому абсолютне значення ПАР\* становило 4,0 і 3,8 відповідно, тобто знижувалося за підвищення концентрацій гексадекану і гліцерину у змішаному субстраті. У той же час за аналогічних умов на суміші гексадекану і глюкози показник ПАР\* становив 426 і

Таблиця 3. Відносне збільшення показників синтезу ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на моно- і змішаних субстратах

Концентрація моносубстратів у суміші, %	Концентрація моно-субстрату (контроль)	ПАР*, % від контролю	$E_{24}$ , % від контролю
Гексадекан, 0,5 + + гліцерин, 0,5	Гексадекан, 0,99	148±7	118±5
	Гліцерин, 1,02	363±15	130±6
Гексадекан, 1,0 + + гліцерин, 1,0	Гексадекан, 1,98	140±7	5±0,2
	Гліцерин, 2,04	422±20	156±7
Гексадекан, 0,5 + + глюкоза, 0,5	Гексадекан, 0,89	123±6	133±6
	Глюкоза, 1,14	427±21	167±8
Гексадекан, 1,0 + + глюкоза, 1,0	Гексадекан, 1,78	133±6	114±5
	Глюкоза, 2,28	215±10	142±7
Гексадекан, 0,5 + + етанол, 0,5	Гексадекан, 0,9	146±7	107±5
	Етанол, 1,1	173±8	114±5
Гексадекан, 1,0 + + етанол, 1,0	Гексадекан, 1,8	162±8	77±4
	Етанол, 2,2	126±6	122±6

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу на відповідних моносубстратах, в яких концентрація вуглецю еквімолярна концентрації змішаного субстрату.

215 % від такого на моносубстраті глюкозі. У деяких випадках (наприклад на суміші гексадекану і гліцерину у концентрації 1 %) практично не спостерігали підвищення показника  $E_{24}$  порівняно з вирощуванням на моносубстраті гліцерині, у той час як за нижчих концентрацій цих моносубстратів у суміші індекс емульгування підвищувався на 30 %.

Такі результати свідчать про необхідність проведення подальших досліджень зі встановлення оптимальних умов синтезу ПАР на суміші енергетично нерівноцінних субстратів. При цьому слід враховувати, що, по-перше, можливе інгібування росту і синтезу ПАР високими концентраціями субстрату. По-друге, необхідно визначити оптимальне для синтезу ПАР молярне співвідношення субстратів у суміші. По-третє, за зміни концентрацій моносубстратів у суміші у середовищі змінюється співвідношення вуглець/азот, що також може впливати на утворення ПАР. І нарешті, для коректної оцінки синтезу ПАР на суміші субстратів необхідне здійснення попередніх теоретичних розрахунків енергетичних потреб цього процесу.

**Висновок.** Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що за умов росту *A. calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів (гексадекан + гліцерин, гексадекан + глюкоза, гексадекан + етанол) можна підвищити у 1,2 – 4 рази показники синтезу поверхнево-активних речовин порівняно з культивуванням бактерій на відповідних моносубстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР на суміші ростових субстратів від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту і концентрації субстратів у суміші.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 304 — 310.
2. Пирог Т.П., Конон А.Д. Интенсификация технологий микробного синтеза практично важливих вторинних метаболітів // Наукові праці НУХТ. — 2010. — № 33. — С. 32 — 35.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугінець О.С. Особенности окиснения этанола у *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 — продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. — 2010. — Т. 72, № 6. — С. 3 — 10.
4. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. — 1985. — V. 131, N 1. — P. 39 — 45.
5. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties // J. Biosci. Bioeng. — 2008. — V. 105, N 5. — P. 493 — 502.
6. Van Bogaert I.N., Saerens K., De Muynck C., Develter D., Soetaert W., Vandamme E.J. Microbial production and application of sophorolipids // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N 1. — P. 23 — 34.

Т.П. Пирог, И.В. Велець,  
А.Д. Конон

#### Синтез поверхнево-активних речовин *acinetobacter calcoaceticus* К-4

на смеси енергетически неравноценных ростовых субстратах

Установлена возможность интенсификации синтеза метаболитов с поверхнево-активными и эмульгирующими свойствами в условиях роста *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на смеси энергетически избыточного (гексадекан) и энергетически дефицитных (глицерин, глюкоза, этанол) субстратов. Условная

концентрация поверхностно-активных веществ (ПАВ) на смеси ростовых субстратов повышалась в 1,2 — 4 раза по сравнению с культивированием штамма К-4 на моносубстратах. Наивысшие показатели синтеза ПАВ на смеси гексадекана и этанола, гексадекана и глюкозы наблюдались при использовании инокулята из соответствующих смешанных субстратов, а на смеси гексадекана и глицерина — в случае применения посевного материала, выращенного на моносубстрате гексадекана.

**Ключевые слова:** поверхностно-активные вещества, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, интенсификация биосинтеза, энергетически неравноценные ростовые субстраты

*T. Pirog, I. Bilets,  
A. Konon*

### The synthesis of surface-active substances of *acinetobacter calcoaceticus* K-4 on mixture of energy unequal growth substrates

The possibility of the synthesis intensification of the metabolites with emulsifying and surface-active properties under the *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 cultivation on mixture of energy excess (hexadecane) and energy deficit (glycerol, glucose, ethanol) substrates was shown. Conditional concentration of the surface-active substances (SAS) on mixed substrates increased in 1,2 — 4 fold as compared with growth of the strain K-4 on monosubstrates. Maximal SAS synthesis on mixture of hexadecane and ethanol, hexadecane and glucose were detected with using the inoculum grown on corresponding mixed substrates, on mixture of hexadecane and glycerol — with using the inoculate grown on hexadecane.

**Key words:** surface active substances, *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, intensification of biosynthesis, energy nonequivalent growth substrates

---

*e-mail:* [tapiro@nuft.edu.ua](mailto:tapiro@nuft.edu.ua)

*Надійшла до редколегії 17 листопада 2010 р.*