

Т.П. Пирог^{1,2}, С.И. Антонюк¹,
А.Д. Конон¹, Т.А. Шевчук², С.А. Парфенюк¹

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ pH НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Исследовали синтез внеклеточных метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами при поддержании pH на уровне 5,0–8,0 в процессе культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на среде с этанолом (2 % по объему).

Установлено, что оптимальным для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *A. calcoaceticus* IMB B-7241 является нейтральное значение pH. Поддержание pH на уровне 7,0 с помощью раствора KOH сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ в 1,8 раза по сравнению с показателями процесса без регуляции pH. Замена KOH на NaOH для поддержания pH на оптимальном уровне приводила к снижению концентрации ПАВ в 1,2–1,5 раза, что обусловлено ингибирующим влиянием катионов натрия на активность ферментов биосинтеза поверхностно-активных amino- и гликолипидов *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Нейтрализация среды раствором KOH в процессе культивирования штамма IMB B-7241 с последующим внесением в конце экспоненциальной фазы fumarата (0,01 %) и цитрата (0,01 %) сопровождалось повышением количества синтезированных ПАВ в 1,2 раза по сравнению с показателями аналогичного процесса без нейтрализации и в 3,5 раза по сравнению с культивированием бактерий на этаноле без органических кислот и регуляции pH.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, регуляция pH, поверхностно-активные вещества, биосинтез, активность ферментов.

Ранее мы сообщали о выделении из загрязненных нефтью образцов почвы штамма *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и акцентировали внимание на его способности синтезировать нехарактерные для представителей рода *Acinetobacter* низкомолекулярные внеклеточные поверхностно-активные вещества (ПАВ) при культивировании на этаноле [3, 4, 6, 9]. Так, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезирует комплекс нейтральных amino- и гликолипидов [3], причем гликолипиды представлены триглицеридами – метаболитами, характерными для бактерий рода *Rhodococcus* [19]. Отметим, что микробный синтез ПАВ на этаноле – достаточно редкое явление, поскольку «классическими» для образования поверхностно-активных веществ являются гидрофобные субстраты (в основном, углеводороды и различные растительные масла) [11, 19, 22, 27, 30].

В предыдущих исследованиях была установлена возможность интенсификации синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на этаноле оптимизацией состава питательной среды (природа источника азота, соотношение C/N, факторы роста и др.) [3, 6], внесением экзогенных предшественников биосинтеза [8], модификацией состава среды (повышение концентрации активаторов и снижение ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза ПАВ) на основе изучения особенностей C₂-метаболизма штамма IMB B-7241 [4, 6, 9].

В то же время при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на этаноле (в отличие от выращивания, например, на жидких парафинах) наблюдали снижение pH к концу процесса до 4–4,5 [3]. Из литературы известно, что для большинства микробных продуцентов оптимальным для синтеза поверхностно-активных веществ является pH, близкое к нейтральному [14, 17, 19, 23, 25, 27, 28]. Исключением являются дрожжи рода *Candida*, для которых оптимальным для синтеза ПАВ гликолипидной природы является pH 5,3–5,7 [12, 20, 21, 26]. Интересно отметить, что максимальный синтез софоролипидов *Candida bombicola* ATCC 22214 *C. bombicola* NRRL Y-17069 наблюдается при pH 3,5 [15, 16].

В связи с изложенным выше целью настоящей работы – исследовать зависимость синтеза поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 от pH.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм *A. calcoaceticus* K-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером IMB B-7241.

© Т.П. Пирог, С.И. Антонюк, А.Д. Конон, Т.А. Шевчук, С.А. Парфенюк, 2012

бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaCl – 1,0, Na₂HPO₄·12H₂O – 0,6, (NH₄)₂CO – 0,35, KH₂PO₄ – 0,14, MgSO₄·7H₂O – 0,1, вода дистиллированная – до 1 л. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [3]). В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 2 % (по объему). Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48 ч), выращенная на средах указанного выше состава с 0,5 % этанола. Количество инокулята – 5 % от объема засеваемой среды (10⁴–10⁵ клеток/мл).

В одном из вариантов в конце экспоненциальной фазы роста (68–72 ч) в среду культивирования вносили цитрат натрия и фумарат натрия в концентрации 0,01 %. Соли органических кислот вносили в виде 10 %-ных растворов.

Для доведения начального значения pH среды до 5,0; 6,0; 7,0; и 8,0 использовали 1 н HCl и 1 н KOH (NaOH). В процессе культивирования, начиная с 20–24 ч, pH культуральной жидкости поддерживали на заданном уровне подщелачиванием 1 н KOH (NaOH).

Культивирование осуществляли в 750 мл колбах со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °C в течение 24–120 ч.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %) определяли, как описано в наших предыдущих работах [3, 6, 9].

Количество синтезированных внеклеточных ПАВ (г/л) определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной нами смесью Фолча [3]. ПАВ-синтезирующую способность определяли как отношение концентрации синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации биомассы и выражали в г ПАВ/г биомассы.

Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 г в течение 20 мин. Выделение внеклеточных ПАВ осуществляли, как описано ниже.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 500 мл помещали 100 мл супернатанта, добавляли 20 мл 1 М раствора HCl, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин., затем добавляли еще 15 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 35 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 100 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50 °C и абсолютном давлении 0,4 атм до постоянной массы.

Качественный анализ внеклеточных поверхностно-активных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Alufohlen Kieselgel 60 («Merck», Германия), как описано ранее [3].

Для получения бесклеточных экстрактов бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °C). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М К⁺-фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М К⁺-фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 с при 4 °C на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2.), фосфоенолпируват- (ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) анализировали как описано ранее [2–5]. При исследовании влияния катионов натрия на активность ферментов отмывание клеток, ультразвуковую обработку и определение активности осуществляли в 0,05 М трис-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация катионов в реакционной смеси составляла 25 и 50 мМ. Катионы вносили в реакционную смесь в виде 20 %-ного раствора NaCl.

Содержание белка в бесклеточных экстрактах рассчитывали по Бредфорд [13]; активность ферментов определяли при 28–30 °С – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB В-7241.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано в работе [1]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. При культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на среде с этанолом в зависимости от начального рН среды его значение снижалось до 4,7–5,2 уже на вторые сутки. Дальнейшее поддержание рН на уровне 5,0–8,0 осуществляли периодическим подщелачиванием культуральной жидкости растворами КОН и NaOH (табл. 1).

Как видно из представленных в табл. 1 данных, условная концентрация ПАВ (ПАВ*) и индекс эмульгирования (E_{24}) изменялись незначительно в исследуемом диапазоне рН по сравнению с показателями процесса без регуляции рН. Однако концентрация синтезированных ПАВ, а также ПАВ-синтезирующая способность повышались до 3,0–3,1 г/л и 2,4–2,6 г ПАВ/г биомассы соответственно при поддержании рН на уровне 6,0–7,0 раствором КОН, что в 1,6–1,8 раза выше, чем без регуляции рН. При нейтрализации культуральной жидкости раствором NaOH показатели синтеза поверхностно-активных веществ были в 1,2–1,3 раза ниже по сравнению с использованием для этой цели КОН (табл. 1).

Дальнейшие эксперименты показали, что катионы натрия являются ингибиторами активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (ФЕП-синтетаза) и аминолипидов (НАДФ⁺-зависимая глутамат-дегидрогеназа) у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (табл. 2). Так, при наличии в реакционной смеси 50 мМ Na⁺ активность ФЕП-синтетазы и глутаматдегидрогеназы снижалась в 1,8 и 5 раз соответственно. Отметим, что в присутствии катионов натрия наблюдали также снижение почти в 2 раза активности ФЕП-карбоксилазы – фермента анаплеротической реакции, восполняющей пул C₃-дикарбоновых кислот (наряду с глиоксилатным циклом) у штамма В-7241, растущего на этаноле [4, 6, 9].

Таблица 1

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на среде с этанолом (2 %) в зависимости от рН

рН	Титрующий агент	ПАВ*	ПАВ, г/л	г ПАВ/г биомассы	E_{24} , %
Без регуляции рН (контроль)	–	3,8±0,19	1,7±0,08	1,5±0,08	60±3,0
5,0	КОН	4,0±0,20	2,2±0,11	1,6±0,08	66±3,3
6,0	КОН	4,2±0,21	3,0±0,15	2,4±0,12	64±3,2
	NaOH	3,5±0,17	2,3±0,12	1,9±0,10	63±3,2
7,0	КОН	4,0±0,20	3,1±0,15	2,6±0,13	68±3,4
	NaOH	3,9±0,20	2,5±0,13	1,9±0,10	63±3,2
8,0	КОН	4,3±0,21	1,8±0,09	1,5±0,08	63±3,2

Примечания. В контрольном варианте (без регуляции рН) конечное значение рН составляло 4,2. Для регуляции рН использовали 1 н растворы КОН и NaOH.

Здесь и в табл. 4: индекс эмульгирования определяли для нативной культуральной жидкости, эмульгируемый субстрат – подсолнечное масло, длительность культивирования 120 ч.

Таблица 2

Влияние катионов натрия на активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241

Na ⁺ в реакционной смеси, мМ	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ ·белка), % от контроля			
	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбокси-киназа	НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
25	72±3,6	Н.о.	20±1,0	70±3,5
50	55±2,8	95±5,0	20±1,0	60±3,0

Примечания. Активность ферментов определяли для клеток, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч). Н.о. – не определяли. Контроль (100 %) – активность ферментов при отсутствии катионов натрия в реакционной смеси.

В табл. 3 представлены данные по качественному составу поверхностно-активных липидов, синтезируемых при различных значениях pH среды культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241. Использование NaOH в качестве титрующего агента для поддержания pH на заданном уровне в процессе выращивания штамма IMB В-7241 сопровождалось снижением спектра образуемых нейтральных, глико- и фосфолипидов по сравнению с применением для титрования раствора KOH.

Полученные результаты следует учитывать при разработке биотехнологии поверхностно-активных веществ, в частности, при выборе титрующего агента.

Ранее [8] нами было показано, что внесение в конце экспоненциальной фазы роста штамма IMB В-7241 на среде с этанолом (2 %) 0,01 % цитрата (регулятор синтеза липидов) и 0,01 % фумарата (C_4 -дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) сопровождалось увеличением количества образуемых ПАВ. Поскольку у большинства бактерий соли органических кислот транспортируются в клетки вместе с протоном и оптимальным для этого является нейтральное значение pH, мы предположили, что нейтрализация культуральной жидкости в процессе роста у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (а также перед внесением органических кислот) будет сопровождаться повышением синтеза поверхностно-активных веществ.

Результаты исследований по влиянию pH на синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в присутствии фумарата и цитрата представлены в табл. 4. Как и при культивировании на этаноле, так и этаноле с внесением органических кислот, поддержание pH на нейтральном уровне сопровождалось повышением концентрации синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности по сравнению с показателями процесса без регуляции pH. Отметим, что максимальная интенсификация синтеза ПАВ (концентрация ПАВ 6,0 г/л, ПАВ-синтезирующая способность 6,2 г ПАВ/г биомассы) наблюдалась при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата, а также использовании раствора KOH для поддержания pH на уровне 7,0. Нейтрализация культуральной жидкости раствором едкого натра сопровождалась снижением количества синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности на 10–12 % по сравнению с показателями, полученными при регуляции pH с помощью KOH (табл. 4). Интересно отметить, что при культивировании штамма IMB В-7241 на этаноле в присутствии органических кислот и использовании KOH в качестве титрующего агента незначительно (на 7–9 %) увеличивался индекс эмульгирования культуральной жидкости по сравнению с аналогичным процессом без регуляции pH.

Таблица 3

Характеристика липидов, синтезированных в различных условиях культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241

pH в процессе культивирования	Титрующий агент	Качественный состав	
		нейтральных липидов	глико- и фосфолипидов
5,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты дифосфатидилглицерин
6,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, пальмитиновая и <i>n</i> -алкановые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты, фосфатидилэтаноламин, диацилглицериды, дифосфатидилглицерин
	NaOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые кислоты	Трегалозомономиколаты, дифосфатидилглицерин
7,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты, диацилглицериды, дифосфатидилглицерин
	NaOH	<i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозомономиколаты, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин

В табл. 3 представлены данные по качественному составу поверхностно-активных липидов, синтезируемых при различных значениях pH среды культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241. Использование NaOH в качестве титрующего агента для поддержания pH на данном уровне в процессе выращивания штамма IMB В-7241 сопровождалось снижением спектра образуемых нейтральных, глико- и фосфолипидов по сравнению с применением для выращивания раствора KOH.

Полученные результаты следует учитывать при разработке биотехнологии поверхностно-активных веществ, в частности, при выборе титрующего агента.

Ранее [8] нами было показано, что внесение в конце экспоненциальной фазы роста штамма IMB В-7241 на среде с этанолом (2 %) 0,01 % цитрата (регулятор синтеза липидов) и 0,01 % умарата (C₄-дикарбоновая кислота, предшественник глюконогенеза) сопровождалось увеличением количества образуемых ПАВ. Поскольку у большинства бактерий соли органических кислот транспортируются в клетки вместе с протоном и оптимальным для этого является нейтральное значение pH, мы предположили, что нейтрализация культуральной жидкости в процессе роста у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (а также перед внесением органических кислот) может сопровождаться повышением синтеза поверхностно-активных веществ.

Результаты исследований по влиянию pH на синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в присутствии fumarата и цитрата представлены в табл. 4. Как и при культивировании на этаноле, так и этаноле с внесением органических кислот, поддержание pH на нейтральном уровне сопровождалось повышением концентрации синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности по сравнению с показателями процесса без регуляции pH. Отметим, что максимальная интенсификация синтеза ПАВ (концентрация ПАВ 6,0 г/л, ПАВ-синтезирующая способность 6,2 г ПАВ/г биомассы) наблюдалась при одновременном внесении в среду этанолом fumarата и цитрата, а также использовании раствора KOH для поддержания pH на уровне 7,0. Нейтрализация культуральной жидкости раствором едкого натра сопровождалась снижением количества синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности на 10–12 % по сравнению с показателями, полученными при регуляции pH с помощью KOH (табл. 4). Интересно отметить, что при культивировании штамма IMB В-7241 на этаноле в присутствии органических кислот и использовании KOH в качестве титрующего агента незначительно (на 7–9 %) увеличивался индекс эмульгирования культуральной жидкости по сравнению с аналогичным процессом без регуляции pH.

Таблица 3

Характеристика липидов, синтезированных в различных условиях культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241

pH в процессе культивирования	Титрующий агент	Качественный состав	
		нейтральных липидов	глико- и фосфолипидов
5,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты, дифосфатидилглицерин
6,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, пальмитиновая и <i>n</i> -алкановые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты, фосфатидилэтаноламин, диацилглицериды, дифосфатидилглицерин
	NaOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые кислоты	Трегалозомономиколаты, дифосфатидилглицерин
7,0	KOH	3-кето-2-алкил жирные кислоты, <i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозодиацилаты, трегалозомономиколаты, диацилглицериды, дифосфатидилглицерин
	NaOH	<i>n</i> -алкановые и миколовые кислоты	Трегалозомономиколаты, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин

Таблица 4

Зависимость синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 от рН на среде с этанолом (2 %) в присутствии органических кислот

Органическая кислота	Титрующий агент	ПАВ, г/л	г ПАВ/г биомассы	E ₂₄ , %
Контроль (без органических кислот)	–	1,7±0,08	1,5±0,08	60±3,0
	КОН	3,1±0,15	2,6±0,13	68±3,4
	NaOH	2,5±0,13	1,9±0,10	63±3,2
Фумарат	–	2,5±0,13	2,7±0,14	61±3,0
	КОН	3,4±0,17	3,0±0,15	70±3,5
	NaOH	2,8±0,14	2,8±0,14	61±3,0
Цитрат	–	2,6±0,13	2,8±0,14	56±2,8
	КОН	3,0±0,15	3,3±0,16	63±3,2
	NaOH	2,7±0,14	3,0±0,15	65±3,3
Фумарат + цитрат	–	5,0±0,25	4,5±0,22	63±3,2
	КОН	6,0±0,30	6,2±0,31	70±3,5
	NaOH	5,4±0,27	5,4±0,27	67±3,4

Примечания. рН поддерживали на уровне 7,0 периодическим подщелачиванием раствором КОН или NaOH, начиная с 20–24 ч культивирования. «–» – Без регуляции рН. Концентрация цитрата и фумарата 0,01 %. Внесение органических кислот осуществляли в конце экспоненциальной фазы роста.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность повышения синтеза поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на этаноле при поддержании рН на нейтральном уровне с помощью КОН и внесении в конце экспоненциальной фазы роста фумарата и цитрата в концентрации 0,01 %.

Обсуждение. Известно, что рН среды культивирования является одним из наиболее значимых факторов, определяющих эффективность технологий микробного синтеза, причем часто значения рН, оптимальные для роста продуцента и образования практически ценных продуктов метаболизма, не совпадают [10].

В случае, если микроорганизмы синтезируют комплекс метаболитов (например, с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами), оптимальное для их образования рН также может различаться. Так, в предыдущих наших исследованиях было установлено, что выращивание *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 на среде с *n*-гексадеканом (2 % по объему) при рН 8,0 сопровождалось интенсификацией синтеза поверхностно-активных веществ [7]. В таких условиях культивирования концентрация внеклеточных ПАВ, удельная скорость их синтеза и ПАВ-синтезирующая способность были максимальными (7,2 г/л, 0,43 ч⁻¹ и 4,2 г ПАВ/г биомассы соответственно), а выход ПАВ от субстрата достигал 50 %. Снижение рН до 7,0–7,5 приводило к ингибированию синтеза ПАВ, однако максимальный индекс эмульгирования культуральной жидкости (100 %) был зафиксирован при поддержании рН на уровне 7,0 [7]. Эти данные свидетельствовали о преимущественном синтезе при нейтральном значении рН метаболитов с эмульгирующими, но не поверхностно-активными свойствами, а также о возможности изменения направленности процессов биосинтеза у штамма IMB Ас-5017 в сторону образования ПАВ либо эмульгатора изменением рН.

Результаты, представленные в данной работе, свидетельствуют о том, что оптимальным для синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 является нейтральное значение рН. В то же время независимо от значения рН (в интервале 5,0–8,0) индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся и составлял 63–68 % (см. табл. 1) или увеличивался незначительно, в частности при культивирования бактерий на этаноле в присутствии фумарата и цитрата и поддержании нейтрального значения рН с помощью раствора КОН (см. табл. 2).

При культивировании *Pichia anomala* PY1 на среде с соевым маслом максимальный синтез как поверхностно-активных веществ, так и метаболитов с эмульгирующими свойствами наблюдался при рН 5,5 [29]. При значении рН, равном 9,0, фиксировали минимальное значение поверхностного натяжения свободной от клеток культуральной жидкости *Pseudomonas aeruginosa* NY3 (32,8 мН/м) и максимальное значение ее индекса эмульгирования (100 %)

[24]. Эти результаты свидетельствуют о том, что для синтеза и ПАВ (рамнолипид), и эмульгатора оптимальным является одно и то же значение pH 9,0. В то же время другие авторы сообщают, что максимальный синтез рамнолипидов на среде с растительными маслами наблюдается при нейтральном значении pH [23, 25].

В процессе выращивания *C. bombicola* NRRL Y-17069 в ферментере на среде, содержащей депротеинизированную сыворотку (90 г/л), глюкозу (10 г/л) и олеиновую кислоту (100 г/л), pH снижалось с 6,0 до 3,5 [15]. Дальнейшее поддержание pH на этом уровне сопровождалось повышением концентрации синтезированных софоролипидов до 33 г/л против 26 г/л в процессе без регуляции pH.

В зависимости от концентрации в среде культивирования продуцента поверхностно-активных маннозилэритритоллипидов *Pseudozyma hubeiensis* SY62 глюкозы (50–200 г/л), оливкового масла (50–200 г/л) и дрожжевого экстракта (1–10 г/л) pH изменялся от 6,0 (начальное значение) до 4,9–6,4 к концу процесса [18]. Авторы акцентируют внимание на отсутствии корреляции между конечным значением pH и уровнем синтеза ПАВ.

Приведенные литературные данные свидетельствуют, что независимо от природы источника углерода в среде культивирования и химической природы синтезированных поверхностно-активных веществ оптимум pH для их синтеза отличается у различных продуцентов. Можно отметить лишь такую общую тенденцию: у большинства дрожжей-продуцентов максимальное образование ПАВ наблюдается в кислой области pH (3,5–5,5) [12, 15, 16, 20, 21, 26, 29], у бактерий – в нейтральной или щелочной [14, 17, 19, 23–25, 27, 28]. В эту закономерность «вписываются» и полученные нами результаты, приведенные в данной работе: оптимальным для синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 является нейтральное значение pH.

Отметим, что практически во всех работах, посвященных исследованию зависимости синтеза ПАВ от pH, авторы не пытаются проанализировать опосредованное через изменение pH влияние природы источника азотного питания на образование поверхностно-активных веществ. В то же время для большинства продуцентов максимальные показатели синтеза ПАВ отмечаются при использовании нитратных (NaNO_3) или нитратно-аммонийных (NH_4NO_3) солей в качестве источника азота [17, 18, 23, 26, 28], что и не удивительно, поскольку ассимиляция нитратов сопровождается повышением pH среды, и именно при таком значении pH наблюдается максимальный синтез ПАВ у этих микроорганизмов. В такой ситуации сложно проанализировать, что больше влияет на синтез ПАВ: природа источника азота или изменение pH, имеющее место в результате ассимиляции этого источника азотного питания. Тем более, что очень часто при изучении влияния pH на синтез ПАВ исследователи изменяют только начальное pH среды, не поддерживая его на определенном уровне в процессе культивирования продуцента.

Наши предыдущие исследования [3] показали, что оптимальным источником азота для биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на этаноле является мочевины. Последующие эксперименты [6] показали, что в таких условиях культивирования наблюдается увеличение активности ФЭП-карбоксилазы – фермента анаэробной реакции, функционирующей на углеводных субстратах. Физиологическая роль этого фермента при выращивании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на среде с этанолом и мочевиной состоит в обезвреживании углекислого газа, образующегося в уреазной реакции; что в свою очередь сопровождается повышением в клетках бактерий пула C_4 -дикарбоновых кислот, усилением глюконеогенеза и синтеза поверхностно-активных гликолипидов.

Поэтому в данной работе мы изучали влияние pH на синтез ПАВ при культивировании штамма IMB В-7241 на среде, содержащей в качестве источника азотного питания мочевины. Отметим, что мочевины является не только источником азота, но и углерода. Однако содержание этой соли в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 составляет всего лишь 0,35 г/л, и дополнительная концентрация углерода, вносимая в среду в виде мочевины ничтожно мала (0,068 г С), в связи с чем не может существенно влиять на биосинтетические процессы в клетках штамма IMB В-7241.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что для получения максимального синтеза целевого продукта необходимо обязательно учитывать природу титрующего агента. Данные литературы показывают, что если и осуществляется регуляция pH при биосинтезе ПАВ,

то для этой цели практически всегда используется раствор соляной кислоты (подкисление или едкого натра (подщелачивание), что в общем-то и понятно, поскольку эти титрующие агенты являются наиболее дешевыми и доступными.

Анализ собственных и литературных данных позволяет сделать вывод о том, что для корректной оценки зависимости синтеза ПАВ от pH среды необходимо: во-первых, поддерживать pH на заданном уровне в процессе культивирования продуцента на средах с различными источниками азотного питания (в идеале такие эксперименты должны предусматривать культивирование микроорганизмов в ферментере), и во-вторых, проведению этих экспериментов должны предшествовать исследования влияния одновалентных катионов (в частности, калия и натрия) на активность ключевых ферментов метаболизма ростового субстрата и биосинтеза целевого продукта.

Отметим также, что в зависимости от состава среды культивирования (содержания в ней одновалентных катионов) эффект от внесения тех же катионов в реакционную смесь и их влияние на активность ферментов может оказаться различным. Так, например, при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде Мюнца (источник азота KNO_3) катионы калия ингибировали активность большинства ферментов биосинтеза ПАВ [9], а в присутствии Na повышалась активность ФЕП-карбоксилазы [6], в то время как на среде с мочевиной наблюдалась обратная картина: активность ферментов биосинтеза поверхностно-активных гликолипидов ингибировалась катионами натрия (см. табл. 2).

В предыдущих исследованиях [8] и в данной работе при изучении влияния фумарата и цитрата на синтез ПАВ штаммом IMB B-7241 органические кислоты вносили в среду с этанолом в виде натриевых солей. Вполне вероятно, что замена их на калиевые соли может сопровождаться увеличением синтеза ПАВ. Выяснению этих вопросов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Таким образом, приведенные в настоящей работе экспериментальные результаты свидетельствуют о необходимости проведения комплекса исследований по влиянию условий культивирования продуцента на биосинтез ПАВ с целью определения оптимальных, обеспечивающих максимальные показатели синтеза целевого продукта.

Т.П. Пирог^{1,2}, С.І. Антонюк¹, А.Д. Конон¹, Т.А. Шевчук², С.А. Парфенюк¹

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

ВПЛИВ pH НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Резюме

Досліджували синтез позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними та емульгуючими властивостями за підтримки pH на рівні 5,0–8,0 у процесі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з етанолом (2 %, об'ємна частка). Встановлено, що оптимальним для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є нейтральне значення pH. Підтримка pH на рівні 7,0 за допомогою розчину КОН супроводжувалася збільшенням кількості синтезованих ПАР у 1,8 разів порівняно з показниками процесу без регуляції pH. Заміна КОН на NaOH для підтримки pH на оптимальному рівні призводила до зниження концентрації ПАР у 1,2–1,5 рази, що зумовлене інгібує впливом катіонів натрію на активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Нейтралізація середовища розчином КОН у процесі культивування штамму IMB B-7241 з наступним внесенням у кінці експоненційної фази фумарату (0,01 %) і цитрату (0,01 %) супроводжувалася підвищенням кількості синтезованих ПАР у 1,2 рази порівняно з показниками аналогічного процесу без нейтралізації та в 3,5 рази порівняно з культивуванням бактерій на етанолі без органічних кислот і регуляції pH.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, регуляція pH, поверхнево-активні речовини, біосинтез, активність ферментів.

T.P. Pirog^{1,2}, S.I. Antonyuk¹, A.D. Konon¹, T.A. Shevchuk², S.A. Parfenyuk¹

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INFLUENCE OF pH ON SYNTHESIS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 BIOSURFACTANTS

Summary

Synthesis of extracellular metabolites with surface-active and emulsifying properties, pH being maintained at the level of 5.8-8.0, in the process of cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 in the medium with ethanol (2%, volume part) was investigated.

It is established that the neutral value of pH is optimal for synthesis of surface-active substances (SAS, biosurfactants) of *A. calcoaceticus* IMV B-7241. The maintenance of pH at the level of 7.0 with the help of KOH solution was accompanied by the 1.8-fold increase of the amount of synthesized SAS as compared with the process indicators without regulation of pH. The substitution of KOH by NaOH to maintain pH at the optimal level led to the 1.2-1.5-fold decrease of SAS concentration that is determined by the inhibiting effect of sodium cations on activity of biosynthesis enzymes of surface-active amino- and glycolipids of *A. calcoaceticus* IMV B-7241.

The medium neutralization by KOH solution in the process of cultivation of the strain IMV B-7241 with further introduction of fumarate (0.01 %) and citrate (0.01 %) at the end of the exponential phase was accompanied by the 1.2-fold increase of the amount of synthesized SAS compared with the indicators of the analogous process without neutralization and by the 3.5-fold increase compared with bacteria cultivation on ethanol without organic acids and pH regulation.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, pH regulation, biosurfactants, biosynthesis, activity of enzymes.

The author's address: Pirog T.P., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine: 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. – 2008. – 77, № 6. – С. 749–757.
3. Пирог Т.П., Антоноук 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. – 45, № 3. – С. 304–310.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугинец О.С. Особенности окисления этанола у продуцента поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Микробиол. журнал. – 2010. – 72, № 6. – С. 3–10.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на n-гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – 46, № 6. – С. 651–658.
6. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долотенко Е.Ю. Роль фосфоенолпируваткарбоксилазы в синтезе поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Микробиол. журнал. – 2011. – 73, № 3. – С. 9–15.
7. Пирог Т.П., Игнатенко С.В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на n-гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – 47, № 4. – С. 436–442.
8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Долотенко Е.Ю. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии органических кислот // Там же. – 2012. – 48, № 6. – С. 631–639.
9. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Антоноук С.И., Кравченко Е.Ю., Иутинская Г.О. Влияние одновалентных катионов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 // Микробиол. журнал. – 2013. – 75, № 2. – С. 10–20.
10. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.

11. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R. Microbial biosurfactant production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 87, N 2. – P. 427–444.
12. Batista R.M., Rufino R.D., Luna J.M., de Souza J.E., Sarubbo L.A. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil // Water Environ. Res. – 2010. – 82, N 5. – P.418–425.
13. Bradford 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.
14. Darvishi P., Ayatollahi S., Mowla D., Niazi A. Biosurfactant production under extreme environment conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2011. – 84, N 1. – P. 292–300.
15. Daverey A., Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrate: production, purification and characterization // Ibid. – 2010. – 79, N 1. – P. 246–253.
16. Kim Y.B., Yun H.S., Kim E.K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture // Biores. Technol. – 2009. – 100, N 23. – P. 6028–6032.
17. Kiran G.S., Thomas T.A., Selvin J. Production of new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardia lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – 78, N 1. – P. 8–16.
18. Konishi M., Nagahama T., Fukuoka T., Morita T., Imura T., Kitamoto D., Hatada Y. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62 // J. Biosci. Bioeng. – 2011. – 111, N 6. – P. 702–705.
19. Lang S., Philp J.C. Surface-active lipids in rhodococci // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – 74, N 1–3. – P. 59–70.
20. Luna J.M., Rufino R.D., Albuquerque C.D., Sarubbo L.A., Campos-Takaki G.M. Economic optimized medium for tension-active agent production by *Candida sphaerica* UCP 0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – 12, N 4. – P. 2463–2476.
21. Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., de Campos-Takaki G.M. Evaluation of antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995 // Curr. Microbiol. – 2011. – 62, N 5. – P. 1527–1534.
22. Muller M.M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 91, N 2. – P. 251–264.
23. Muller M.M., Hormann B., Kugel M., Syldek C., Hausmann R. Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874 // Ibid. – 2011. – 89, N 3. – P. 585–592.
24. Nie M., Yin X., Ren C., Wang Y., Xu F., Shen Q. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NY3 // Biotechnol. Adv. – 2010. – 28, N 5. – P. 635–643.
25. Reis R.S., Goncalves da Rocha, Chapeaurouge D.A., Domont G.B., Santa Anna L.M.M., Freire D.M.G., Perales J. Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production // Process Biochem. – 2010. – 45, N 9. – P. 1504–1510.
26. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and antiadhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2011. – 84, N 1. – P. 1–5.
27. Shaligram N.S., Singhal R.S. Surfactin – a review on biosynthesis, fermentation, purification and application // Food Technol. Biotechnol. – 2010. – 48, N 2. – P. 119–134.
28. Silva S.N.R.L., Farias C.B.B., Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – 79, N 1. – P. 174–183.
29. Thaniyavarn J., Chianguthai T., Sangvanish P., Roongsawang N., Washio K., Morikawa M., Thaniyavarn J. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – 72, N 8. – P. 2061–2068.
30. Van Bogaert I.N.A., Zhang J., Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids // Proc. Biochem. – 2011. – 46, N 4. – P. 821–833.

Отримано 15.10.201