

Физиологические основы интенсификации синтеза микробных поверхностно-активных веществ

Установлено, что реализация физиологических подходов к регуляции процессов биосинтеза микробных поверхностно-активных веществ (выявление возможных сайтов метаболического лимитирования, связанных с синтезом вторичных метаболитов, и разработка подходов к их устранению; внесение в среду экзогенных предшественников биосинтеза; определение совокупности оптимальных внешних факторов, обеспечивающих максимальный синтез целевого продукта; использование смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов) позволяют повысить показатели синтеза в 10–30 раз по сравнению с активностью исходных штаммов.

It was shown that realization of physiological bases of regulation of microbial surfactants biosynthesis (analyses of metabolic pathways, elucidation of «bottlenecks» in producer's metabolism and search for ways toward their elimination; addition of biosynthesis exogenic precursors into a growth medium; determination of total optimal external factors for maximal synthesis; using the mixture of energy unequal growth substrates) allowed to increase biosynthesis indices of 10–30 fold as compared to activity of initial strains.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) широко используются в различных отраслях промышленности, в связи с чем спрос на синтетические ПАВ постоянно растет. Вместе с тем темпы развития биотехнологии на современном этапе и повышение внимания к сохранению окружающей среды обусловили большой интерес исследователей к микробным ПАВ как альтернативе химическим аналогам [1, 2]. Поверхностно-активные вещества микробного происхождения имеют ряд преимуществ перед синтетическими соединениями: биodeградельность; стабильность свойств в широком диапазоне рН и температуры; нетоксичность.

Из загрязненных нефтью образцов почвы нами выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (регистрационные номера в Депозитории Института микробиологии и вирусологии НАН Украины ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 соответственно), а также *Nocardia vaccinii* К-8 и установлена их способность к синтезу ПАВ на гидрофильных (этанол) и гидрофобных (гексадекан) субстратах, а также на отходах промышленности (нефтяной, масло-жировой, производства биодизеля).

Определение оптимальных условий культивирования продуцентов, обеспечивающих максимальный синтез ПАВ (температура, рН, природа и концентрация источников углерода и азота, соотношение С/Н, способ подачи субстрата, режимы массообмена и др.), позволили увеличить показатели синтеза целевого продукта в 3,5–5 раз.

Снижение в этанолсодержащей среде культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 концентрации K^+ до 1 мМ (ингибитор алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ и ферментов биосинтеза ПАВ – НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы, ФЕП-карбоксикиназы), а также повышение содержания аммонийного азота (активатор этих ферментов) до 10 мМ в результате замены нитрата калия на эквимолярную по азоту концентрацию мочевины сопровождалось увеличением в 1,5–3 раза активности ферментов и концентрации ПАВ по сравнению с показателями на исходной среде.

При внесении в гексадекансодержащую среду культивирования *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 36 мкмоль/л ионов железа (II), необходимого для функционирования алкангидроксилазы, повышение до 35 мМ содержания Na^+ (активатор алкангидроксилазы и НАДФ⁺-альдегиддегидрогеназы), снижение концентрации K^+ до 1 мМ (ингибитор ферментов) наблюдали увеличение активности ферментов метаболизма н-гексадекана, а также повышение в 4 раза синтеза ПАВ по сравнению с показателями на немодифицированной среде [3].

Внесение в среду с углеводородами для выращивания штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 0,05 мМ Cu^{2+} (активатор алкангидроксилазы АлкБ типа) сопровождалось увеличением синтеза ПАВ в 1,5–2 раза по сравнению с показателями на среде без меди.

Установлена возможность повышения на 60–300 % синтеза ПАВ при внесении в стационарной фазе роста штаммов в среду с неуглеводными субстратами (глицерин, этанол, гексадекан, пережаренное масло, жидкие парафины) предшественников биосинтеза (0,01–0,2 %): глюкозы, растительного масла, C_4 -дикарбоновых кислот (предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов) [4, 5].

На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза поверхностно-активных трегалозомиколатов и биомассы на энергетически дефицитном субстрате (глицерин) установлена концентрация энергетически избыточного гексадекана, позволяющая повысить эффективность конверсии углерода обоих субстратов в ПАВ. При молярном соотношении концентраций гексадекана и глицерина 1:7 концентрация синтезированных штаммами ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 внеклеточных ПАВ повышалась на 300–350 % по сравнению с показателями на моносубстрате глицерине [6].

Масштабирование процесса биосинтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на ферментационное оборудование позволила увеличить почти в два раза концентрацию ПАВ и сократить в 3,5 раза продолжительность культивирования продуцента по сравнению с выращиванием в колбах на качалке [7].

Указанные подходы к интенсификации синтеза микробных ПАВ могут быть использованы для повышения эффективности любых технологий микробного синтеза.

Литература

1. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 87, N 2. – P. 427–444.
2. Van Bogaert I.N.A., Zhang J., Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids // Proc. Biochem. – 2011. – 46, N 4. – P. 821–833.
3. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – 46, N 6. – P. 599–606.
4. Пирог Т.П., Грищенко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. – 2011, Т. 73, № 4. – С. 15–24.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Шулякова М.О. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 у середовищі з гліцеролом // Біотехнологія. – 2012. Т.5, № 4. – С. 88–95.
6. Pirog T. P., Konon A. D., Shevchuk T. A., Bilets I. V. Intensification of biosurfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on a hexadecane–glycerol mixture // Microbiology. – 2012. – 81, N 5. – P. 565–572.
7. Pirog T.P., Ignatenko S.V. Scaling of the process of biosynthesis of biosurfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. – 2011. – 47, N 4. – P. 393–399.