

THE INTENSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES SYNTHESIS BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 ON ETHANOL

A. Konon, T. Pirog, O. Voloshina
National University of Food Technologies

Key words: Surfactants Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 Ethanol Intensification Regulation of pH Precursor biosynthesis	ABSTRACT The effect of fumarate (C4-dicarboxylic acid, the precursor of gluconeogenesis) and citrate (regulator of lipid synthesis) on the formation of surface-active substances (SAS) during cultivation of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 on ethanol was investigated. It was found that the adding of fumarate (0,01 %) and citrate (0,01 %) at the same time to the medium with ethanol (2 %, v/v) at the end of the exponential phase was accompanied by the increasing of the surfactants synthesis at 195 %, as compared to the parameters of synthesis in the medium without organic acids. The neutralization of culture medium using the KOH solution during cultivation of strain IMV B-7241 with addition of organic acids in the late exponential phase allowed to increase the concentration of surfactant 1,2 times as the same process without neutralization.
Article history: Received 20.03.2013 Received in revised form 19.05.2013 Accepted 23.05.2013	
Corresponding author: E-mail: tapirog@nuft.edu.ua	

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 НА ЕТАНОЛІ

А.Д. Конон, Т.П. Пирог, О.С. Волошина
Національний університет харчових технологій

Вивчено вплив фумарату (С₄-дикарбонова кислота, попередник глюконеогенезу) і цитрату (регулятор синтезу ліпідів) на утворення поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 на етанолі. Встановлено, що одночасне внесення фумарату (0,01 %) і цитрату (0,01 %) у кінці експоненційної фази росту штаму IMV B-7241 на середовищі з етанолом (2 %, об'ємна частка) супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих ПАР на 195 % порівняно з показниками синтезу на середовищі без органічних кислот. Нейтралізація середовища розчином КОН у процесі культивування штаму IMV B-7241 з подальшим внесенням в кінці експоненційної фази органічних кислот дала змогу підвищити концентрацію ПАР в 1,2 рази порівняно з показниками аналогічного процесу без нейтралізації.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, етанол, інтенсифікація, регуляція pH, попередники біосинтезу

Поверхнево-активні речовини мікробного походження є відносно новим продуктом біотехнології, оскільки активно почали досліджуватися у 70 – 80 роках ХХ ст. Ці сполуки

мають суттєві переваги перед синтетичними аналогами, зокрема, біодеградабельність і нетоксичність, що значно знижує забруднення навколишнього середовища у разі практичного використання; характеризуються стійкістю в широкому діапазоні температури; рН та солоності середовища; різноманітною біологічною активністю. Унікальність мікробних ПАР полягає у тому, що вони можуть використовуватися у різних галузях промисловості (харчовій, хімічній та ін.), сільському господарстві, а також у процесах біоремедіації, видобутку нафти, медицині та фармацевтиці [6, 8 – 10].

У попередніх дослідженнях показано, що *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту, утворює низькомолекулярні поверхнево-активні речовини (комплекс нейтральних, аміно- і гліколіпідів, гліколіпіди представлені трегалозоміколатами) за умов росту на гідрофобних (*n*-гексадекан, рідкі парафіни) і гідрофільних (етанол, глюкоза) субстратах [3]. Встановлено умови культивування штаму ІМВ В-7241 на етанолі, які забезпечують максимальні показники синтезу ПАР.

Нині у світі основною сировиною для синтезу ПАР є гідрофобні субстрати (найчастіше гексадекан і рідкі парафіни) [6]. Слід зазначити, що етанол є значно дешевшим і технологічнішим субстратом порівняно з гідрофобними водонерозчинними сполуками, а отже, використання його для біосинтезу ПАР дає змогу знизити витрати на культивування. Проте за таких умов культивування вихід цільового продукту залишається невисоким.

Одним із підходів до підвищення ефективності мікробних технологій є внесення у середовище екзогенних попередників біосинтезу — проміжних продуктів метаболізму ростового субстрату (первинні метаболіти), які є вихідними для процесів конструктивного метаболізму або регуляторами (індукторами) синтезу цільового продукту [2].

Так, раніше було показано, що внесення 0,2 % фумарату (попередник глюконеогенезу) і 0,1 % цитрату (регулятор синтезу ліпідів) на початку стаціонарної фази за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі супроводжувалося збільшенням показників синтезу ПАР на 40 – 100 % порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без фумарату і цитрату [4]. Підвищення синтезу ПАР за таких умов зумовлене посиленням глюконеогенезу, що підтверджувалося збільшенням в 1,5 і 3,5 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (ключових ферментів гліоксилатного циклу і глюконеогенетичної гілки обміну речовин відповідно), а також синтезу ліпідів, про що могло свідчити зниження в 1,5 рази активності ізоцитратдегідрогенази [4]. Збільшення в 1,5 – 1,7 разів концентрації ПАР у разі внесення у середовище культивування *R. erythropolis* ЕК-1 з *n*-гексадеканом 0,2 % фумарату і 0,1 % цитрату зумовлене інтенсифікацією синтезу трегалозоміколатів, що підтверджувалося підвищенням у 3 – 5 разів активності ФЕП-синтетази і трегалозофосфатсинтази відповідно [5].

Мета роботи — дослідження можливості інтенсифікації синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі за присутності фумарату (попередник глюконеогенезу) і цитрату (регулятор синтезу ліпідів).

Штам *A. calcoaceticus* К-4 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером ІМВ В-7241.

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; рН 6,8-7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів [3] — 0,1 % (об'ємна частка).

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол 2,0 % (об'ємна частка).

Як попередники синтезу ПАР використовували цитрат натрію (0,01–0,5 %) і фумарат натрію (0,01 – 0,5 %). Цитрат натрію і фумарат натрію вносили в середовище у вигляді 10 %-х розчинів на початку процесу культивування, а також в кінці експоненційної — початку стаціонарної фази росту.

Оскільки цитрат і фумарат є додатковими джерелами вуглецевого живлення, і при додаванні їх у середовище змінюється не тільки концентрація вуглецю, а й співвідношення С/Н; у контрольних варіантах здійснювали корекцію вмісту основного

МІКРОБІОЛОГІЯ

джерела вуглецевого живлення (етанол). Мета корекції — ввести еквімолярну кількість вуглецю для забезпечення стабільності оптимального співвідношення вуглець/азот в середовищі культивування продуцента.

У деяких варіантах у процесі культивування, починаючи з 20 – 24 год і до внесення органічних кислот, рН культуральної рідини підтримували на рівні 7,0 підлужненням 1 н КОН (NaOH).

Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) упродовж 120 год при 30 °С.

Посівним матеріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з експоненційної фази росту, вирощена на рідкому середовищі наведеного вище складу з етанолом (1,0 %). Концентрація посівного матеріалу (10^4 – 10^5 клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР*, безрозмірна величина), індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини, а також кількість позаклітинних синтезованих ПАР (г/л) [3]. ПАВ-синтезувальну здатність визначали як відношення концентрації синтезованих ПАР (г/л) до концентрації біомаси і виражали у г ПАР/г біомаси.

На першому етапі, аналогічно дослідженням, проведеним з *R. erythropolis* ЕК-1 [4, 5], вивчали вплив попередників (0,1 – 0,5 %) на синтез ПАР у разі внесення їх у середовище з етанолом у кінці експоненційної — початку стаціонарної фази росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Встановлено, що ефект від внесення 0,1 – 0,3 % цитрату був практично відсутній (умовна концентрація ПАР не відрізнялася від такої у контрольному варіанті без попередника і становила 4,0 – 4,2), а для таких же концентрацій фумарату — виявився незначним (підвищення показника ПАР* на 20 % за концентрації фумарату 0,1 %). Крім того, у міру збільшення концентрації органічних кислот до 0,5 % спостерігали зниження показника умовної концентрації ПАР.

У зв'язку з цим на наступному етапі досліджень концентрацію фумарату і цитрату знижували до 0,01 – 0,05 % і здійснювали внесення органічних кислот у середовище з етанолом як на початку процесу культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, так і в кінці експоненційної фази росту. Показано, що найвищі показники синтезу ПАР (до 5,0 г/л) спостерігалися за одночасного внесення фумарату і цитрату в концентрації 0,01 % в кінці експоненційної фази росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив цитрату і фумарату на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі

Концентрація органічних кислот, %	ПАР, г/л	E_{24} , % (1:49)
Цитрат, 0,01	2,6±0,13	91±4
Цитрат, 0,02	2,6±0,13	100±5
Фумарат, 0,01	2,8±0,14	100±5
Фумарат, 0,02	2,5±0,12	87±4
Цитрат, 0,01 + Фумарат, 0,01	5,0±0,25	89±4
Цитрат, 0,02 + Фумарат, 0,02	3,2±0,16	79±4
Контроль (без органічних кислот)	1,7±0,09	88±4

Примітки. Внесення цитрату і фумарату здійснювали в кінці експоненційної фази росту (48 год культивування). E_{24} (1:49) — індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини. Субстрат для емульгування — соняшникова олія.

МІКРОБІОЛОГІЯ

За внесення органічних кислот у концентрації 0,02 % спостерігали підвищення синтезу ПАР до 3,2 г/л, що майже у два рази вище, ніж на середовищі без органічних кислот.

Таким чином, оптимальна концентрація фумарату і цитрату, що забезпечує підвищення синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі, виявилася на порядок нижчою, ніж для *R. erythropolis* ЕК-1 [4, 5]. Для обох штамів істотно збільшення показників синтезу ПАР спостерігали лише у разі внесення органічних кислот в кінці експоненційної — початку стаціонарної фази росту. Зазначимо, що на відміну від *R. erythropolis* ЕК-1 [4, 5], під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як на етанолі, так і етанолі за присутності фумарату і цитрату, індекс емульгування культуральної рідини практично не змінювався.

За умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі з етанолом вже на другу добу спостерігали зниження рН культуральної рідини до 5,5–5,7, а до кінця процесу — до 4,5–5,0. Оскільки у більшості бактерій солі органічних кислот транспортуються в клітини шляхом симпорту з протоном [11] і оптимальним для цього є нейтральне значення рН, ми припустили, що нейтралізація в процесі росту штаму (і перед внесенням органічних кислот) буде супроводжуватися підвищенням синтезу ПАР.

Результати досліджень впливу рН на синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за присутності фумарату і цитрату наведено у табл. 2. Встановлено, що у процесі культивування на етанолі з внесенням органічних кислот, підтримання рН на нейтральному рівні супроводжувалося підвищенням концентрації синтезованих ПАР і ПАР-синтезувальної здатності порівняно з показниками процесу без регуляції рН. Зазначимо, що максимальна інтенсифікація синтезу ПАР (концентрація ПАР 6,0 г/л, ПАР-синтезувальна здатність 6,2 г ПАР/г біомаси) досягалася за одночасного внесення у середовище з етанолом фумарату і цитрату, а також за використання розчину КОН для підтримання рН на рівні 7,0. Нейтралізація культуральної рідини розчином їдкого натру супроводжувалася зниженням показників синтезу ПАР на 10–12 % порівняно з регуляцією рН за допомогою КОН (табл. 2). Цікаво зазначити, що при культивуванні штаму ІМВ В-7241 на етанолі за присутності органічних кислот і використанні КОН як титрувального агенту незначно (на 7–9 %) збільшувався індекс емульгування культуральної рідини порівняно з аналогічним процесом без регуляції рН.

Таблиця 2. Вплив рН на синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі за присутності органічних кислот

Органічна кислота	Титрувальний агент	ПАР, г/л	г ПАР/ г біомаси	E ₂₄ , %
Контроль (без органічних кислот)	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	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	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	КОН	6,0±0,30	6,2±0,31	70±3,5
	NaOH	5,4±0,27	5,4±0,27	67±3,4

Примітки. рН підтримували на рівні 7,0 періодичним підключенням розчином КОН або NaOH, починаючи з 20–24 год культивування. Концентрація цитрату і фумарату 0,01 %. Внесення органічних кислот здійснювали в кінці експоненційної фази росту.

Встановлені нами закономірності щодо впливу попередників біосинтезу на утворення ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 відрізняються від таких для штаму *R. erythropolis* ЕК-1

[4, 5]: по-перше, оптимальна концентрація fumarату і цитрату для штаму ІМВ В-7241 в 10 разів нижча; по-друге, ефект від спільного внесення органічних кислот у середовище культивування штаму ІМВ В-7241 з етанолом суттєвіший — концентрація ПАР збільшувалася більше ніж у три рази, у той час як для штаму *R. erythropolis* ЕК-1 — всього в 2 рази.

Результати наших досліджень відрізняються також і від відомих літературних даних. По-перше, в літературі описано збільшення синтезу ПАР за наявності в середовищі тільки цитрату, який вносили на початку процесу культивування [1, 7]. По-друге, оптимальна концентрація цитрату при цьому становила 0,5 – 1,0 %. За такої концентрації цитрат можна розглядати не як регулятор синтезу ліпідів, а як додатковий ростовий субстрат. Зазначимо також, що нам не вдалося знайти в літературі даних про інтенсифікацію синтезу ПАР за одночасного внесення у середовище як цитрату, так і С₄-дикарбонових кислот.

Крім того, отримані нами результати свідчать, що для максимального синтезу цільового продукту необхідно обов'язково враховувати природу титрувального агенту. З літератури відомо, що у разі регуляція рН при біосинтезі ПАР практично завжди використовується розчин соляної кислоти (підкислення) або їдкого натру (підлужнення), що й зрозуміло, оскільки ці титрувальні агенти є найбільш дешевими і доступними.

Зазначимо, що у даній роботі під час вивчення впливу fumarату і цитрату на синтез ПАР штамом ІМВ В-7241 органічні кислоти вносили в середовище з етанолом у вигляді натрієвих солей. Цілком імовірно, що заміна їх на калієві солі може супроводжуватися збільшенням синтезу ПАР. З'ясуванню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Висновок

Таким чином, в результаті проведеної роботи показано можливість інтенсифікації синтезу ПАР штамом *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за внесення в середовище з етанолом попередників біосинтезу ліпідної та вуглеводної природи. Встановлено оптимальні концентрації цитрату і fumarату (0,01 %), внесення яких у кінці експоненційної фази росту забезпечує підвищення на 195 % показників синтезу ПАР, а підтримання рН на нейтральному рівні розчином КОН — ще майже на 60 %.

Література

1. Леськ О.Ю. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства / О.Ю. Леськ, С.А. Елисеев, О.В. Популях, Ю.В. Карпенко // Микробиол. журн. — 1991. — Т. 53, № 2. — С. 36 – 40.
2. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: «Наукова думка», — 2010. — 327 с.
3. Пирог Т.П. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ / Т.П. Пирог, И.С. Антонок, Е.В. Карпенко, Т.А. Шевчук // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45. №3. — С. 304–310.
4. Пирог Т.П. Особенности С₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Т.А. Шевчук, Д.А. Тарасенко // Микробиология. — 2009. — Т. 77, № 6. — С. 749 – 757.
5. Пирог Т.П. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Ю.А. Клименко // Прикл. биохимия и микробиология. — 2010. — Т. 46., № 6. — С. 651 – 658.
6. Banat I.M. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 87, № 2. — P. 427 – 444.

7. De Roubin M.R. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity / M.R. de Roubin, C.N. Mulligan, B.F. Gibbs // Can. J. Ind. Microbiol. — 1989. — Vol. 35, № 9. — P. 854 – 859.

8. Marchant R. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants / R. Marchant, I.M. Banat // Biotechnol. Lett. — 2012. — Vol. 34, № 9. — P. 1597 – 1605.

9. Pacwa-Plociniczak M. Environmental applications of biosurfactants: recent advances / M. Pacwa-Plociniczak, G.A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget, S.S. Cameotra // Int. J. Mol. Sci. — 2011. — Vol. 12, № 1–2. — P. 633 – 654.

10. Rodrigues L.R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices / L.R. Rodrigues // Adv. Exp. Med. Biol. — 2011. — Vol. 715. — P. 351 – 367.

14. Thaniyavarn J. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala* / J. Thaniyavarn, T. Chianguthai, P. Sangvanish, N. Roongsawang, K. Washio, M. Morikawa, S. Thaniyavarn // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2008. — Vol. 72, N 8. — P. 2061 – 2068.

ИНТЕНСИФИКАЦІЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНО- АКТИВНИХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 НА ЭТАНОЛЕ

А.Д. Конон, Т.П. Пирог, О.С. Волошина

Национальный университет пищевых технологий

*Изучено влияние фумарата (С₄-дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов) на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на этаноле. Установлено, что одновременное внесение фумарата (0,01 %) и цитрата (0,01 %) в конце экспоненциальной фазы роста штамма ІМВ В-7241 на среде с этанолом (2 % по объему) сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ на 195 % по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот. Нейтрализация среды раствором КОН в процессе культивирования штамма ІМВ В-7241 с последующим внесением в конце экспоненциальной фазы органических кислот позволила увеличить концентрацию ПАВ в 1,2 раза по сравнению с показателями аналогичного процесса без нейтрализации.*

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, этанол, интенсификация, регуляция pH, предшественники биосинтеза*