

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, М.О. Шулякова<sup>1</sup>, Д.О. Тарасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

## ВПЛИВ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017

Показано доцільність заміни цитрату натрію (регулятор синтезу ліпідів) у середовищі культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 з етанолом (або гексадеканом) і фумаратом (попередник глюконеогенезу) на лимонну кислоту для підтримання рН на оптимальному для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) рівні.

Встановлено, що максимальний синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 спостерігався за рН 8,0. Внесення 0,2 % фумарату натрію у кінці експоненційної фази росту штаму IMB Ac-5017 на середовищі з 2 % етанолу з наступним періодичним підкисленням культуральної рідини лимонною кислотою до рН 8,0 супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР на 30, 40 і 95 % порівняно з аналогічним процесом без регуляції рН, використанням як регулятора синтезу ліпідів цитрату натрію і на середовищі з етанолом без органічних кислот відповідно.

**К л ю ч о в і с л о в а:** поверхнево-активні речовини, біосинтез, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, регуляція рН, етанол, гексадекан, органічні кислоти.

Для підвищення ефективності технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів, у тому числі й поверхнево-активних речовин (ПАР), дослідники використовують такий прийом, як внесення у середовище культивування продуцентів так званих додаткових, або вторинних джерел вуглецю, які називають також попередниками біосинтезу.

У праці [13] було показано, що конструктивний метаболізм *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877, пов'язаний з синтезом поверхнево-активних манозилеритритолліпідів, характеризується невисокою активністю глюконеогенезу. Тому було запропоновано для підвищення синтезу ПАР вносити у середовище з гліцерином так зване «вторинне джерело вуглецю» – манозу або еритритол, що входять до складу ПАР і які автори називають також попередниками біосинтезу [14]. Встановлено, що за присутності досліджуваних попередників кількість ПАР підвищувалася на 30–50 %. Цікаво зазначити, що глюкоза не спричиняла позитивного впливу на утворення ПАР [14]. У той же час, за присутності глюкози у середовищі культивування інших штамів-продуцентів манозилеритритолліпідів (*Pseudozyma siamensis* CBS 9960 і *Pseudozyma hubeiensis* KM-59) спостерігали підвищення синтезу ПАР до 50 % [12, 15]. Як ростові субстрати для штамів CBS 9960 і KM-5 використовували сафлорову олію або гліцерин. Слід зазначити, що концентрація глюкози у середовищі з олією була досить високою – 4 % (стільки ж, як і основного ростового субстрату). Очевидно, що у цьому разі глюкоза слугувала додатковим джерелом вуглецю, і навряд чи термін «попередник біосинтезу» є доречним.

У 80–90-х роках ХХ ст. дослідниками було встановлено стимулювальну дію цитрату натрію на синтез ПАР мікроорганізмами [2, 10, 16]. Відомо, що цитрат є ефективним стимулятором ліпогенезу, особливо у ліпід-синтезувальних дріжджів [2, 11]. У зв'язку з цим його присутність в середовищі культивування приводить до підвищення синтезу ПАР ліпідної природи. Такий ефект можна пояснити активуючим впливом цитрату натрію на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, що каталізує перетворення ацетил-КоА в малоніл-КоА, що, в свою чергу, супроводжується збільшенням синтезу жирних кислот, а відповідно, і ліпідних ПАР. Слід зазначити, що для вирощування деяких продуцентів ПАР використовують агаризоване середовище, в яке добавляють цитрат натрію [17].

У попередніх наших дослідженнях встановлено можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності у середовищі з етанолом чи гексадеканом цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і фумарату (попередник глюконеогенезу) [4–8].

Показано, що збільшення показників синтезу ПАР за умови внесення у середовище з етанолом цитрату (0,1 %) і фумарату (0,2 %) на початку стаціонарної фази росту продуцента

зумовлене активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення у 1,4–1,5 і 3,4–3,6 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетези, відповідно, а також зниження у 1,5–1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази [4–7].

Внесення фумарату і цитрату у середовище з *n*-гексадеканом супроводжувалося інтенсифікацією синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів, про що засвідчило підвищення у 1,3–1,6 рази за таких умов кількості синтезованих поверхнево-активних речовин і збільшення у 3–5 раз активності фосфоенолпіруватсинтетези (ключового ферменту глюконеогенезу) і трегалозофосфатсинтази [7, 8].

Зазначимо, що у попередніх дослідженнях [4–8] фумарат і цитрат вносили у середовище культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у вигляді натрієвих солей, асиміляція яких у мікроорганізмів здійснюється симпортом з протоном, що супроводжується підвищенням рН культуральної рідини до 9–9,5. Згідно з літературними даними, для більшості продуцентів поверхнево-активних речовин оптимальним для синтезу цих сполук є рН, близьке до нейтрального [11, 15, 16]. У зв'язку з цим ми припустили, що використання замість цитрату натрію лимонної кислоти дасть змогу унеможливити значне підвищення рН і таким чином збільшити кількість синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017 поверхнево-активних речовин.

Мета роботи – дослідити можливість регуляції рН лимонною кислотою за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з етанолом (гексадеканом) і фумаратом для інтенсифікації синтезу ПАР.

**Матеріали і методи.** Об'єкт досліджень – штамп *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за номером IMB Ac-5017.

*R. erythropolis* IMB Ac-5017 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 1,3;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовували *n*-гексадекан і етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

У кінці експоненційної фази і у стаціонарній фазі росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у середовище з етанолом і гексадеканом вносили (% масова частка): фумарат натрію (0,01; 0,2 і 0,3), цитрат натрію (0,01 і 0,1) або лимонну кислоту (0,08; 0,16 і 0,24). Концентрації цитрату натрію (0,1 %) і лимонної кислоти (0,08 %) еквімолярні за вуглецем. Фумарат натрію, цитрат натрію і лимонну кислоту вносили у середовище у вигляді 10 %-вих розчинів. В одному з варіантів у кінці експоненційної фази росту штаму IMB Ac-5017 у середовище з етанолом (гексадеканом) вносили тільки фумарат (0,2 %) і у міру підвищення рН здійснювали періодичну нейтралізацію культуральної рідини розчином лимонної кислоти.

Оскільки фумарат і цитрат (лимонна кислота) є додатковими джерелами вуглецевого живлення і за умови добавлення їх у середовище змінюється не лише концентрація вуглецю, а й співвідношення C:N, у контрольних варіантах коригували це співвідношення за рахунок внесення додаткових кількостей етанолу або гексадекану.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу з 1,0 % *n*-гексадекану або 1,0 % етанолу.

Вирощування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 144 год.

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснювали також у ферментаторі АК-210 (Пушино, Росія) об'ємом 10 л (робочий об'єм 7 л) упродовж 48 год при 28 °С. Початкова концентрація гексадекану становила 0,2 % (об'ємна частка). У процесі культивування бактерій здійснювали дробне внесення субстрату порціями по 0,3–0,4 % кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4 %. На початку процесу швидкість перемішування становила 250 об/хв, витрати повітря – 0,2 л/л середовища за хв. У процесі культивування швидкість перемішування збільшували до 380–400 об/хв, а витрати повітря – до 1,2 л/л середовища за хв, підтримуючи концентрацію розчиненого кисню ( $\text{pO}_2$ ) на рівні 60–70 % (від насичення повітрям). Упродовж культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у ферментаторі значення рН підтримували на рівні 7,0; 7,5; 8,0 і 8,5 підкисленням 1 н розчином  $\text{HCl}$  або підлужненням 1 н розчином  $\text{NaOH}$ .

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютну суху масу за калібрувальним графіком. Максимальну питому швидкість росту ( $\mu_{\text{макс}}$ ) і синтезу ПАР ( $P_{\text{макс}}$ ) розраховували за загальноприйнятими формулами [3].

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг ( $\sigma_s$ ) вільної від клітин культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР\*), індекс емульгування ( $E_{24}$ ) розбавленої у 50 разів культуральної рідини, які визначали як описано у працях [4, 5, 8]. Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів з супернатанту культуральної рідини модифікованою сумішшю Фолча і подальшим випарюванням розчинника на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

ПАР-синтезувальну здатність штаму ІМВ Ас-5017 розраховували як відношення кількості синтезованих ПАР (г/л) до концентрації біомаси і виражали у г ПАР/г біомаси. Вихід ПАР від субстрату визначали як відношення кількості синтезованих ПАР (г/л) до концентрації заданого субстрату (в г/л) і виражали у відсотках.

Усі досліди проводили у трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у праці [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** На першому етапі досліджували можливість заміни 0,1 % цитрату натрію на еквімолярну за вуглицем концентрацію лимонної кислоти (0,08 %) у процесі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з етанолом (гексадеканом) і фумаратом натрію (0,2 %). Як видно з наведених у табл. 1 даних, за внесення лимонної кислоти індекс емульгування культуральної рідини практично не змінювався, а показник умовної концентрації ПАР підвищувався на 8–9 % порівняно з використанням цитрату натрію. У разі використання 0,08 % лимонної кислоти рН до кінця культивування знижувалося до 8,4–8,5, що майже на одиницю нижче порівняно з внесенням цитрату натрію.

Оскільки наші попередні дослідження, проведені зі штамом *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 [9], показали, що оптимальними для інтенсифікації синтезу ПАР є концентрації фумарату і цитрату 0,01 % (тобто на порядок нижчі, ніж встановлені для штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017), на наступному етапі аналізували синтез ПАР штамом ІМВ Ас-5017 за внесення у середовище з етанолом і гексадеканом різних концентрацій органічних кислот (табл. 1).

Таблиця 1

**Синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на етанолі і гексадекані за присутності фумарату натрію, цитрату натрію і лимонної кислоти**

Джерело вуглецю	Концентрація органічних кислот, %	pH <sub>кін</sub>	ПАР*	E <sub>24</sub> , % (1:49)
Етанол	0	7,2 ± 0,36	3,0 ± 0,12	60 ± 3
	Фумарат натрію, 0,2 + цитрат натрію, 0,1	9,3 ± 0,47	4,5 ± 0,23	56 ± 3
	Фумарат натрію, 0,2 + лимонна кислота, 0,08	8,5 ± 0,42	4,9 ± 0,25	57 ± 3
	Фумарат натрію, 0,02 + цитрат натрію, 0,01	7,4 ± 0,37	3,7 ± 0,19	55 ± 3
	Фумарат натрію, 0,02 + лимонна кислота, 0,008	7,0 ± 0,35	3,9 ± 0,2	58 ± 3
Гексадекан	0	7,5 ± 0,38	3,8 ± 0,10	44 ± 2
	Фумарат натрію, 0,2 + цитрат натрію, 0,1	9,4 ± 0,48	6,0 ± 0,3	48 ± 2
	Фумарат натрію, 0,2 + лимонна кислота, 0,08	8,4 ± 0,42	6,5 ± 0,33	47 ± 2
	Фумарат натрію, 0,02 + цитрат натрію, 0,01	8,1 ± 0,41	4,6 ± 0,23	47 ± 2
	Фумарат натрію, 0,02 + лимонна кислота, 0,008	7,5 ± 0,38	5,0 ± 0,25	48 ± 2

**Примітки.** Концентрації цитрату натрію і лимонної кислоти еквімолярні за вуглицем. Концентрація етанолу і гексадекану 2 %. Органічні кислоти вносили у середовище у кінці експоненційної фази росту (48 год). Тут і у табл. 2–5 – як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Встановлено, що зменшення концентрацій органічних кислот у 10 разів супроводжувалось зниженням умовної концентрації ПАР у 1,2–1,3 рази. Проте, навіть за низьких концентрацій органічних кислот, у разі заміни цитрату натрію на лимонну кислоту спостерігали незначне (5–9 %) підвищення синтезу ПАР та зниження рН.

Оскільки за внесення 0,2 % фумарату натрію і 0,08 % лимонної кислоти спостерігали зростання рН культуральної рідини до 8,3–8,4, припустили, що подальше підвищення концентрації лимонної кислоти (а можливо, й фумарату) дасть змогу стабілізувати значення рН на рівні нейтрального і, ймовірно, за рахунок цього підвищити показники синтезу ПАР (табл. 2). За підвищення концентрації лимонної кислоти до 0,16–0,24 % у середовищі культивування

*R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 показники синтезу метаболітів з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями збільшувалися на 16–35 % порівняно з використанням 0,08 % лимонної кислоти. Причому, за умов росту штаму ІМВ Ас-5017 на етанолі у разі використання фумарату у вищій концентрації (0,3 %) мало місце підвищення синтезу тільки метаболітів з емульгуювальними властивостями, а на гексадекані – тільки збільшення синтезу поверхнево-активних речовин. У міру підвищення концентрації лимонної кислоти спостерігали зниження рН до кінця процесу культивування до 6,7–6,1.

У разі внесення різних концентрацій фумарату натрію і лимонної кислоти наприкінці експоненційної фази росту часто спостерігали підвищення не тільки синтезу ПАР, а й біомаси. Тому на наступному етапі досліджували синтез ПАР залежно від моменту внесення у середовище з етанолом і гексадеканом органічних кислот (табл. 3).

Експерименти показали, що у разі внесення фумарату натрію і лимонної кислоти у стаціонарній фазі росту спостерігається зниження синтезу як метаболітів з поверхнево-активними, так і емульгуювальними властивостями порівняно із додаванням органічних кислот у кінці експоненційної фази росту. За внесення фумарату натрію і лимонної кислоти у стаціонарній фазі росту відбувається суттєвіше зниження рН до кінця процесу (табл. 3).

Таблиця 2

**Вплив концентрації лимонної кислоти на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з етанолом і гексадеканом за присутності фумарату натрію**

Джерело вуглецю	Концентрація фумарату натрію, %	Концентрація лимонної кислоти, %	рН <sub>кін</sub>	ПАР*, % до контролю	Е <sub>24</sub> *, % до контролю
Етанол	0,2	0,16	6,7 ± 0,34	116 ± 5,8	121 ± 6,05
		0,24	6,2 ± 0,31	131 ± 6,55	121 ± 6,05
	0,3	0,16	7,0 ± 0,35	98 ± 4,9	119 ± 5,95
		0,24	6,7 ± 0,34	99 ± 4,95	122 ± 6,1
Гексадекан	0,2	0,16	6,8 ± 0,34	122 ± 6,1	120 ± 6,0
		0,24	6,6 ± 0,33	135 ± 6,75	130 ± 6,5
	0,3	0,16	6,6 ± 0,33	127 ± 6,35	97 ± 4,85
		0,24	6,1 ± 0,31	116 ± 5,8	98 ± 4,9

**П р и м і т к и.** Контроль (100 %) – показники синтезу ПАР за внесення 0,2 % фумарату натрію і 0,08 % лимонної кислоти. Концентрація етанолу і гексадекану 2 %. Внесення органічних кислот здійснювали у кінці експоненційної фази росту (48 год)

Таблиця 3

**Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 від моменту внесення у середовище з етанолом і гексадеканом фумарату натрію і лимонної кислоти**

Джерело вуглецю	Концентрація лимонної кислоти, %	Момент внесення органічних кислот (фаза росту)	рН <sub>кін</sub>	ПАР*, % до контролю	Е <sub>24</sub> *, % до контролю
Етанол	0,16	кінець експоненційної	6,7 ± 0,33	116 ± 5,8	121 ± 6,05
		стаціонарна	6,6 ± 0,33	94 ± 4,7	115 ± 5,75
	0,24	кінець експоненційної	6,2 ± 0,31	131 ± 6,55	121 ± 6,05
		стаціонарна	5,1 ± 0,26	88 ± 4,4	88 ± 4,4
Гексадекан	0,16	кінець експоненційної	6,8 ± 0,34	122 ± 6,1	120 ± 6,0
		стаціонарна	6,5 ± 0,32	99 ± 4,95	108 ± 5,4
	0,24	кінець експоненційної	6,6 ± 0,33	135 ± 6,75	130 ± 6,5
		стаціонарна	6,3 ± 0,32	89 ± 4,45	112 ± 5,6

**П р и м і т к и.** Контроль (100 %) – показники синтезу ПАР за внесення 0,2 % фумарату натрію і 0,08 % лимонної кислоти. Концентрація етанолу і гексадекану 2 %, фумарату натрію – 0,2 %.

Наведені у табл. 2 і 3 дані свідчать, що за результатами проведених досліджень не можна зробити однозначного висновку про взаємозв'язок (залежність) між внесенням у середовище лимонної кислоти, рН і синтезом ПАР.

Тому на наступному етапі встановлювали оптимальне для синтезу ПАР штамом ІМВ Ас-5017 значення рН. У таких дослідженнях культивування штаму ІМВ Ас-5017 здійснювали у ферментаторі АК-210 (табл. 4). Експерименти показали, що підтримання рН середовища на рівні 8,0 дало змогу інтенсифікувати синтез метаболітів з поверхнево-активними властивостями. За такого режиму культивування концентрація позаклітинних ПАР становила 7,15 г/л, а вихід ПАР від заданого субстрату досягав 50 %. Водночас найвищий індекс емульгування культуральної рідини (100%) було зафіксовано за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 при рН 7,0. Аналогічні закономірності були встановлені й у разі вирощування штаму ІМВ Ас-5017 на середовищі з етанолом.

Враховуючи результати, наведені у табл. 1–4, можна дійти висновку, що досягти суттєвого підвищення синтезу ПАР за рахунок підтримання оптимального значення рН (8,0) одночасним внесенням у середовище з етанолом чи гексадеканом фумарату натрію і лимонної кислоти, досить важко. Це зумовлене ще й тим, що ефективність транспорту органічних кислот у клітини, а отже, й ефективність використання їх у синтезі ПАР залежить також і від значення рН, за якого вносяться у середовище органічні кислоти, і від наступних змін рН, що відбуваються в результаті асиміляції цих кислот клітинами штаму ІМВ Ас-5017.

У зв'язку з цим на наступному етапі аналізували як змінюється рН культуральної рідини через кілька годин після внесення фумарату натрію і лимонної кислоти, і чи залежить зміна рН від порядку внесення кислот. Встановлено, що у разі внесення у середовище з етанолом чи гексадеканом тільки фумарату натрію (0,2 %) рН знижується незначно (з 7,0 до 6,8–6,9) і ця зміна не є критичною, однак у разі додавання лимонної кислоти (як окремо, так і з фумаратом) зниження рН середовища є більш суттєвим (5,1–5,4), що може негативно впливати на синтез ПАР.

Таблиця 4

**Залежність показників синтезу поверхнево-активних речовин та росту  
*R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 від рН середовища**

рН	$\mu_{\max}^*$ , год <sup>-1</sup>	ПАР, г/л	$P_{\max}^*$ , год <sup>-1</sup>	$E_{24}^*$ , %	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г АСБ	Вихід ПАР від субстрату, %
7,0	0,13 ± 0,01	2,13 ± 0,11	0,13 ± 0,01	100 ± 5	1,10 ± 0,05	14,8 ± 0,7
7,5	0,12 ± 0,01	4,22 ± 0,21	0,20 ± 0,01	68 ± 3	2,00 ± 0,10	29,3 ± 1,4
8,0	0,10 ± 0,01	7,15 ± 0,36	0,43 ± 0,02	50 ± 2	3,40 ± 0,17	49,7 ± 2,4
8,5	0,11 ± 0,01	6,41 ± 0,32	0,21 ± 0,01	52 ± 2	3,20 ± 0,16	47,3 ± 2,3

**Примітки.** Час досягнення  $\mu_{\max}$  та  $P_{\max}$  у всіх варіантах становив 6 та 30 год відповідно. Концентрація біомаси (АСБ) 2,0–2,1 г/л. Індекс емульгування визначали для нативної культуральної рідини.

Тому припустили, що можна підвищити ефективність процесу, якщо наприкінці експоненційної фази росту у середовище внести тільки фумарат натрію, а лимонною кислотою здійснювали періодичне титрування до оптимального для синтезу ПАР рівня (рН 8,0).

Результати, наведені у табл. 5 свідчать, що навіть за періодичного доведення рН до 8,0 лимонною кислотою спостерігали підвищення на 30 % умовної концентрації ПАР порівняно з показниками процесу без регуляції рН, коли у середовище з етанолом одночасно добавляли фумарат натрію і лимонну кислоту. У разі титрування лимонною кислотою показник ПАР\* був на 40 % вищим, ніж за наявності у середовищі фумарату і цитрату натрію, і на 95 % – порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот. За періодичної регуляції рН лимонною кислотою на 14–20 % підвищувався й індекс емульгування культуральної рідини (табл. 5). Важливо зазначити, що у разі використання замість лимонної кислоти розчину гідроокису натрію для періодичного підкислення культуральної рідини упродовж вирощування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з етанолом і фумаратом натрію спостерігали незначне (на 5–8 %) підвищення умовної концентрації ПАР.

Отже, одержані під час виконання роботи дані засвідчують, що заміна цитрату натрію на еквімолярну за вуглецем концентрацію лимонної кислоти супроводжується підвищенням синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в результаті як регуляції рН до оптимального для синтезу ПАР рівня, так і стимуляції ліпогенезу.

**Вплив періодичної регуляції рН лимонною кислотою на синтез ПАВ  
за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі  
з етанолом і фумаратом**

Концентрація органічних кислот, %	Регуляція рН упродовж процесу	рН <sub>кінц</sub>	ПАВ*, % від контролю	Е <sub>24</sub> †, % від контролю
Фумарат натрію 0,2 + цитрат натрію, 0,1	–	9,3±0,47	155± 5	125± 5
Фумарат натрію 0,2 + лимонна к-та 0,08	–	8,5 ± 0,2	165 ± 5	130 ± 5
Фумарат натрію 0,2	+	8,0 ± 0,2	195 ± 5	144 ± 6

**П р и м і т к и.** Культивування здійснювали у колбах на качалці. Фумарат (в одному з варіантів і лимонну кислоту) вносили у кінці експоненційної фази росту. Титрування до рН 8,0 здійснювали лимонною кислотою 1 раз на добу. Індекс емульгування визначали для нативної культуральної рідини. Контроль – середовище з етанолом (2 %) без внесення органічних кислот.

*Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Шевчук Т.А.<sup>2</sup>, Шулякова М.А.<sup>1</sup>, Тарасенко Д.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий, Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

**ВЛИЯНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017**

Резюме

Показана целесообразность замены цитрата натрия (регулятор синтеза липидов) в среде культивирования *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 с этанолом (или гексадеканом) и фумаратом (предшественник глюконеогенеза) на лимонную кислоту для поддержания рН на оптимальном для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) уровне. Установлено, что максимальные показатели синтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 наблюдались при рН 8,0. Внесение 0,2 % фумарата натрия в конце экспоненциальной фазы роста штамма ИМВ Ас-5017 на среде с 2 % этанола с последующим периодическим подкислением культуральной жидкости лимонной кислотой до рН 8,0 сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 30, 40 и 95 % по сравнению с аналогичным процессом без регуляции рН, использованием в качестве регулятора синтеза липидов цитрата натрия и на среде с этанолом без органических кислот соответственно.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** поверхностно-активные вещества, биосинтез, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, регуляция рН, этанол, гексадекан, органические кислоты.

*T.P.Pirog<sup>1,2</sup>, T.A. Shevchuk<sup>2</sup>, M.O. Shulyakova<sup>1</sup>, D.O. Tarasenko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>National University of Food Technologies, Kyiv

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**INFLUENCE OF CITRIC ACID ON SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS  
OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV Ас-5017**

S u m m a r y

Expediency of sodium citrate (regulator of lipids synthesis) substitution is shown in the medium of cultivation of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017 with ethanol (or hexadecane) and fumarate (gluconeogenesis precursor) by citric acid for pH maintenance at the level optimal for synthesis of surfactants.

It has been established the maximum synthesis of surfactants of *R.erythropolis* IMV Ас-5017 was observed at pH 8.0. Introduction of 0.2% sodium fumarate at the end of experimental growth phase of the strain IMV Ас-5017 in the medium with 2% of ethanol with further periodic acidification of culture liquid by citric acid up to pH 8.0 was accompanied by the increase of conditional concentration of surfactants by 30, 40 and 95% as compared with an analogous process without pH regulation, by the use of sodium citrate as the regulator of lipids synthesis on the medium with ethanol as well as without organic acids, respectively.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** biosurfactants, biosynthesis, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, pH regulation, ethanol, hexadecan, organic acids.

**The authors' address:** Pirog T.P., National University of Food Technologies, 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Лесык О.Ю., Елисеев С.А., Подулях О.В., Карпенко Ю.В. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // Микробиол. журн. – 1991. – **53**, № 2. – С. 36–40.
3. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. – 331 с.
4. Пирог Т.П., Тарасенко Д.А. Влияние fumarата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 48–55.
5. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C<sub>2</sub>-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. – 2008. – **77**, № 6. – С. 749–757.
6. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.О. Роль экзогенних попередників в утворенні поверхнево-активних речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі // Микробиол. журнал. – 2008. – **70**, № 6. – С. 11–18.
7. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Особливості синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Микробиол. журнал. – 2010. – **72**, № 2. – С. 10–15.
8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – **46**, № 6. – С. 651–658.
9. Пирог Т.П., Щербина А.В., Билец И. Интенсификация синтеза биосурфактантов *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Мат-лы Межд. научн. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (31 мая-4 июня 2010 г., Минск, Беларусь). – С.146-148.
10. de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // Can. J. Microbiol. – 1989. – **35**, N 9. – P. 854–859.
11. Hu Y., Ju L.K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS // Enz. Microb. Technol. – 2001. – **21**, N 2. – P. 593–601.
12. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **78**, N 1. – P. 37–46.
13. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – **73**, N 2. – P. 305–315.
14. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317 // J. Biosci. Bioeng. – 2007. – **104**, N 1. – P. 78–81
15. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – **105**, N 5. – P. 493–502.
16. Sturver O., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain *Torulopsis apicola* // J. Biotechnology. – 1987. – **6**, N 2. – P. 259–269.
17. Takanashi C., Nozawa T., Tanikawa T., Nakagawa Y., Wakita J., Matsushita M., Matsuyama T. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – **280**, N 2. – P. 169–175.

Отримано 12.10.2010