

**Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², А.Д. Конон¹,
М.А. Шулякова¹, Г.А. Иутинская²**

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

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 И *RHODOCOCOCCUS* *ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017 В СРЕДЕ С ГЛИЦЕРИНОМ

Установлена возможность использования в качестве субстрата для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 глицерина – побочного продукта производства биодизеля.

Максимальные показатели синтеза ПАВ штаммом ИМВ В-7241 зафиксированы при наличии в среде с глицерином дрожжевого автолизата и микроэлементов. Показана возможность интенсификации синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси гексадекана и глицерина в концентрации 0,5–1,0 % (по объему). При использовании инокулята, выращенного на гексадекане, условная концентрация ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смешанном субстрате была на 56–100, а *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – на 260–320 % выше, чем на моносубстрате глицерине.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, глицерин, смешанные субстраты.

В предыдущих исследованиях [1] нами была показана возможность синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Nocardia vaccini* К-8 на глицерине. Интерес к глицерину как субстрату для микробного синтеза обусловлен тем, что в последние годы в связи с расширением производства биодизеля в мире этот спирт из разряда «целевых» технологических продуктов перешел в категорию отходов. Такое положение дел стало причиной серьезных изменений во многих отраслях промышленности. Так, например, Procter and Gamble и другие косметические компании прекратили выпуск собственного глицерина [18]. Сверхбыстрое увеличение производства биодизеля создало избыток технического глицерина (побочного продукта трансэтерификации растительных масел и животных жиров), что привело к снижению цены на этот продукт в 10 раз только за последние годы [18].

На сегодняшний день около 80 % получаемого в мире биодизеля производится в странах Европейского союза [3]. Основным сырьем для его получения в Европе является рапсовое масло. Одним из альтернативных путей утилизации глицерина – побочного продукта производства биодизеля – является его использование в технологиях микробного синтеза практически ценных продуктов [3, 18].

Ранее мы сообщали о способности изолированных нами штаммов *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ) при культивировании на гидрофильных и гидрофобных субстратах: гексадекан, жидкие парафины, этанол, глюкоза [14, 15].

Цель данной работы – исследовать возможность использования глицерина для получения ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы *A. calcoaceticus* К-4 и *R. erythropolis* ЭК-1, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номерами ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 соответственно.

R. erythropolis ИМВ Ас-5017 выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 1,3, NaCl – 1,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8–7,0.

A. calcoaceticus ИМВ В-7241 культивировали на среде такого же состава, за исключением источника азота: вместо NaNO_3 в среду вносили $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ в концентрации 0,35 г/л. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [15]), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001.

В качестве источника углерода и энергии использовали глицерин в концентрации 0,5–2,04 % (по объему), *n*-гексадекан – 0,5–1,98 % (по объему), этанол – 1 %, а также смесь *n*-гексадекана и глицерина в концентрации 0,5–1,0 %.

Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48–60 ч), выращенная на средах указанного выше состава. В качестве источника углерода и энергии при получении инокулята использовали глицерин, *n*-гексадекан, этанол в концентрации 0,5 %, а также смесь *n*-гексадекана (0,25 %) и глицерина (0,25 %). Среда для получения посевного материала *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 содержала также (в различных комбинациях) дрожжевой автолизат – 0,5 %, раствор микроэлементов – 0,1 % и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 г/л.

Количество инокулята – 5 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл). Культивирование осуществляли в 750 мл колбах со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °С в течение 24–120 ч.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %) определяли, как описано в наших предыдущих работах [1, 14, 15].

Для получения бесклеточных экстрактов культуральную жидкость, полученную после выращивания *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в жидкой минеральной среде с глицерином или этанолом, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (рН 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (рН 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40–60 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Культуральную жидкость, полученную после выращивания *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в жидкой минеральной среде с *n*-гексадеканом, обрабатывали гексаном для удаления остатков *n*-гексадекана, после чего отделяли клетки бактерий фильтрованием под вакуумом на воронке Бюхнера. Осадок клеток на бумажном фильтре последовательно (под вакуумом) промывали гексаном и 0,05 М K^+ -фосфатным буфером, рН 7,0. Отмытые клетки суспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере, рН 7,0, после чего разрушали ультразвуком как описано выше.

Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) измеряли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина (НДМА) при 440 нм с этанолом, *n*-гексадеканолом и глицерином как донорами электронов как описано ранее [2]. Активность глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49) и ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) анализировали согласно [2].

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [1, 14, 15]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследование роста и образования ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с глицерином показало, что штаммы способны ассимилировать этот субстрат и синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами (табл. 1). При повышении содержания глицерина в среде культивирования обоих штаммов условная концентрация ПАВ увеличивалась, однако была ниже, чем на гексадекане или этаноле [14, 15], а также в 1,6–1,8 раза ниже, чем у штамма *Nocardia vaccini* К-8, растущего на глицерине [1]. В связи с этим следующий этап исследований был посвящен поиску путей повышения синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с глицерином.

Ранее нами было показано, что при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на этаноле показатели синтеза ПАВ увеличивались при наличии в среде дрожжевого автолизата и микроэлементов [15]. Поэтому исследовали образование ПАВ штаммом ИМВ В-7241 на среде с глицерином, в которую вносили дрожжевой автолизат, микроэлементы и сульфат железа (табл. 2). Исследование роли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в синтезе ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241

обусловлено тем, что в присутствии сульфата железа в среде с глицерином наблюдали максимальные показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 [1]. Отметим, что существенное повышение синтеза ПАВ штаммом К-8 имело место при внесении $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в среду как для получения инокулята, так и для синтеза поверхностно-активных веществ. В наших первых экспериментах с *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с сульфатом железа выращивали только посевной материал.

Таблица 1

**Рост и синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241
и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на глицерине**

Штамм	Концентрация глицерина, %	Биомасса, г/л	ПАВ*	E_{24}^* , %
<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	0,5	0,5±0,02	1,5±0,07	39±3
	1,0	0,8±0,04	2,4±0,12	36±4
<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017	0,5	1,2±0,06	2,0±0,10	37±2
	1,0	1,5±0,07	2,5±0,12	47±2

Примечания. Посевной материал выращен на среде с 0,5 % глицерина и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Среда для культивирования штамма ИМВ В-7241 содержала дрожжевой автолизат и микроэлементы. Табл. 1, 2, 4 и 5: продолжительность культивирования 120 ч.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, исключение $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ из состава среды для получения инокулята сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ, причем, независимо от способа подготовки посевного материала, показатели синтеза ПАВ при культивировании штамма ИМВ В-7241 на среде с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ были ниже, чем на среде без сульфата железа. Наиболее высокое значение показателя условной концентрации ПАВ (3,2) зафиксировано при выращивании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с глицерином, дрожжевым автолизатом и микроэлементами (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние дрожжевого экстракта, микроэлементов и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
на синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241**

Наличие в среде культивирования			ПАВ*	
дрожжевого автолизата	микроэлементов	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	I	II
+	+	–	2,4±0,12	3,2±0,16
–	+	–	2,1±0,10	2,6±0,13
+	–	–	2,6±0,13	2,8±0,14
–	–	+	1,8±0,09	2,0±0,10
+	+	+	1,9±0,09	2,3±0,11
–	+	+	1,7±0,08	2,1±0,10
+	–	+	1,6±0,08	2,2±0,11

Примечания. Концентрация глицерина в среде для получения инокулята 0,5, в среде для биосинтеза – 1 %. Инокулят выращен на среде с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (I) и без $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (II).

Отметим, что наличие сульфата железа в среде для получения инокулята и биосинтеза ПАВ не влияло на концентрацию биомассы *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241. Эти результаты могут свидетельствовать об ингибировании катионами железа ферментов биосинтеза ПАВ у штамма ИМВ В-7241, что было подтверждено в наших дальнейших экспериментах (табл. 3). Так, в присутствии 0,1 мМ сульфата железа наблюдали снижение в 1,4–1,7 раза активности всех исследуемых ферментов биосинтеза аминокислот и гликолипидов у штамма В-7241, кроме ФЕП-синтетазной активности, которая в таких условиях повышалась в 1,4 раза. Однако отметим, что при наличии в реакционной смеси 0,5 мМ сульфата железа активность этого фермента также снижалась (табл. 3). Повышение концентрации $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ до 0,5–1,0 мМ сопровождалось 100 %-ным ингибированием активности ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы. В присутствии 1,0 мМ сульфата железа ингибировалась полностью и активность глутаматдегидрогеназы.

Влияние катионов железа на активность ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241

Концентрация FeSO ₄ ·7H ₂ O, мМ	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)			
	НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-синтаза	ФЕП-карбоксилаза	ФЕП-карбоксикиназа
0	223±11	1684±88	191±9	159±8
0,1	161±8	2389±119	127±6	96±5
0,5	6±34	1242±62	0	0
1,0	0	2261±113	0	0

Примечания. Концентрация глицерина в среде культивирования 1 %. Инокулят выращен на среде с дрожжевым автолизатом и микроэлементами. Активность ферментов определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч).

Исследование субстратной специфичности НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 показало, что независимо от источника углерода в среде культивирования бактерий (глицерин, этанол, *n*-гексадекан) ферменты обоих штаммов способны окислять все исследуемые спирты (табл. 4). Интересно отметить, что в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, выращенных на этаноле и *n*-гексадекане, алкогольдегидрогеназная активность с глицерином как акцептором электронов была на порядок выше, чем в экстракте после культивирования бактерий на глицерине (90–130 и 9,7 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). Подобная картина наблюдалась и для *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (табл. 4).

Таблица 4

Субстратная специфичность НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017

Ростовой субстрат	Субстрат при определении активности	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
		<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017
Этанол	Этанол	79±3,9	27±1,3
	<i>n</i> -Гексадеканол	45±2,2	18±0,9
	Глицерин	90±4,5	55±2,7
<i>n</i> -Гексадекан	Этанол	260±13	74±3,5
	<i>n</i> -Гексадеканол	779±38	147±7
	Глицерин	130±6	154±8
Глицерин	Этанол	14,5±0,7	24±1,2
	<i>n</i> -Гексадеканол	29±1,4	45±2,2
	Глицерин	9,7±0,4	18±0,9

Примечание. Активность определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в ранней экспоненциальной фазе роста (24–36 ч). Концентрация субстратов в среде культивирования 1 % (по объему). Среда для получения инокулята и культивирования штамма ИМВ В-7241 содержала дрожжевой автолизат и микроэлементы.

Результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что одним из подходов к повышению синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 может быть использование смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов.

Известно, что, независимо от путей метаболизма *n*-гексадекана и глицерина у различных микроорганизмов, первый субстрат всегда является энергетически избыточным, а второй – энергетически дефицитным [2]. Учитывая это обстоятельство, а также установленную нами широкую субстратную специфичность алкогольдегидрогеназ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (см. табл. 4), предположили, что культивирование обоих штаммов на смеси гексадекана и глицерина будет сопровождаться интенсификацией синтеза ПАВ по сравнению с использованием для выращивания бактерий моносубстратов.

Поскольку показатели и роста и синтеза целевого продукта на смешанных субстратах зависят от качества инокулята [2], на следующем этапе исследовали влияние природы источника углерода в среде для получения посевного материала на образование ПАВ *A. calcoaceticus*

ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017. Данные по культивированию штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 на моно- и смешанных субстратах представлены в табл. 5. Результаты показали, что максимальное значение условной концентрации ПАВ на смеси гексадекана и глицерина наблюдалось при использовании инокулята, выращенного на моносубстрате гексадекана. В таких условиях культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 показатель ПАВ* был в 1,5 и 3,6, а *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – в 1,3 и 1,6 раза выше, чем на гексадекана и глицерине соответственно (табл. 5). Отметим, что при выращивании обоих штаммов на смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов не наблюдали существенного повышения уровня биомассы по сравнению с культивированием бактерий на моносубстратах.

Таблица 5

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на моно- и смешанных субстратах в зависимости от качества инокулята

Концентрация источника углерода в среде, %	Концентрация источника углерода в среде для получения инокулята, %	ПАВ*	
		<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017
Гексадекан, 0,5 + глицерин, 0,5	Гексадекан, 0,5	4,0±0,2	3,9±0,19
	Глицерин, 0,5	2,7±0,13	3,4±0,17
	Гексадекан, 0,25 + глицерин, 0,25	2,2±0,11	3,6±0,18
Гексадекан, 0,99	Гексадекан, 0,5	2,7±0,13	3,0±0,15
Глицерин, 1,02	Глицерин, 0,5	1,1±0,05	2,5±0,12

Примечания. Табл. 4 и 5 – концентрации моно- и смешанных субстратов эквивалентны по углероду; при получении инокулята *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в среду вносили дрожжевой экстракт и микроэлементы.

На следующем этапе исследовали синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в зависимости от концентрации моносубстратов в смеси. В этих экспериментах использовали инокулят, выращенный на среде с гексадеканом. Данные по относительному увеличению показателей синтеза ПАВ на смеси различных концентраций гексадекана и глицерина представлены в табл. 6. Полученные результаты показали, что и при повышении в два раза концентрации моносубстратов в смеси условная концентрация ПАВ и индекс эмульгирования культуральной жидкости *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 были выше, чем при культивировании бактерий на гексадекана и глицерине.

Представленные данные свидетельствуют о возможности использования глицерина для получения ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в качестве энергетически дефицитного субстрата в смеси с энергетически избыточным гексадеканом.

С каждым годом спектр продуктов микробного синтеза, получаемых на отходах производства биодизеля, стремительно растет. Если еще около пяти лет назад основное внимание исследователей было направлено на анаэробную микробную трансформацию глицерина с целью получения спиртов и кетонов, [18], то на сегодняшний день установлена возможность использования этого субстрата для синтеза органических кислот, пигментов, поверхностно-активных веществ [3]. В нашей предыдущей работе [1] мы упоминали о получении на основе глицерина фенилаланина и экзополисахаридов. Совсем недавно в литературе появились сообщения о синтезе на глицерине нового экзополисахарида *Pseudomonas oleovorans* NRRL В-14682 [6], использовании дрожжей *Rhodotorula glutinis* для биоконверсии глицерина в липиды и каротиноиды [5, 16], галофильных бактерий для получения водорода из глицерина [8].

Полученные нами результаты показали возможность синтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-4271 на глицерине. При росте на этом субстрате условная концентрация ПАВ была ниже, чем на этаноле и гексадекана. Тем не менее, широкая субстратная специфичность НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-4271 (см. табл. 3) позволила нам выдвинуть предположение о том, что можно повысить синтез ПАВ, используя для этого смесь энергетически неравноценных ростовых субстратов, в частности, энергетически избыточного гексадекана и энергетически дефицитного глицерина.

Литературные и наши собственные данные свидетельствуют о перспективности использования смеси ростовых и неростовых субстратов для интенсификации как роста микроорга-

низмов, так и синтеза практически ценных метаболитов, как было показано нами на примере микробного экзополисахарида этаполана [2]. До недавнего времени в литературе в основном были сведения о повышении лишь синтеза биомассы на смешанных субстратах, причем касались они достаточно ограниченной группы микроорганизмов, являющихся объектами конкретных промышленных технологий. Это, прежде всего, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, молочнокислые бактерии, бактерии-деструкторы труднодоступных органических соединений (в том числе, и «загрязнителей» окружающей среды).

Таблица 6

Относительное увеличение показателей синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси гексадекана и глицерина

Концентрация моносубстратов в смеси, %	Концентрация моносубстрата, % (контроль)	ПАВ*, % от контроля		E ₂₄₇ , % от контроля	
		ИМВ В-7241	ИМВ Ас-5017	ИМВ В-7241	ИМВ Ас-5017
Гексадекан, 0,5 + глицерин, 0,5	Гексадекан, 0,99	148±7	130±6	118±5	128±6
	Глицерин, 1,02	363±15	156±7	130±6	95±5
Гексадекан, 1,0 + глицерин, 1,0	Гексадекан, 1,98	140±4	120±6	105±5	110±5
	Глицерин, 2,04	422±20	200±10	156±7	95±5

Примечания. Контроль (100 %) – показатели синтеза ПАВ на соответствующих моносубстратах, в которых концентрация углерода эквивалентна концентрации смешанного субстрата.

Отметим, что и на сегодняшний день основные работы по этому вопросу посвящены дрожжам-сахаромикетам, в связи с использованием их для получения биоэтанола из растительной биомассы [17]. В данном случае основные усилия направлены на решение проблемы совместной утилизации дрожжами глюкозы и ксилозы. Тем не менее, в последние годы появились сведения об интенсификации синтеза на смешанных субстратах аминокислоты валина (продуцент *Corynebacterium glutamicum* [10]), антибиотика пенициллина (продуцент *Penicillium chrysogenum* [19]).

Известны работы по исследованию синтеза ПАВ на смеси так называемых «первичных» (или основных) и «вторичных» (дополнительных) источников углерода [4, 7, 9, 11–13]. Чаще всего дополнительными субстратами для синтеза поверхностно-активных гликолипидов являются углеводы, вносимые в среду с гидрофобными соединениями (чаще – различными растительными маслами) как в начале процесса культивирования, так и на разных фазах роста продуцента (чаще – в стационарной).

Так, внесение глюкозы (4 %) в среду культивирования продуцентов манозилэритритоллипидов (*Pseudozyma siamensis* CBS 9960 и *Pseudozyma hubeiensis* KM-59) сопровождалось повышением синтеза ПАВ на 50 % по сравнению с выращиванием штаммов на сафлоровом масле или глицерине [9, 11]. Концентрация основного ростового субстрата составляла 4 % (как и глюкозы). При добавлении глюкозы в среду с рапсовым маслом наблюдали увеличение в 1,8 раза синтеза софоролипидов *Candida bombicola* ATCC 22214 [7]. В работе [4] сообщается, что максимальный синтез софоролипидов *C. bombicola* NRRL Y-17069 (33 г/л) отмечался на среде, содержащей депротеинизированную пшеницу (90 г/л), глюкозу (10 г/л) и олеиновую кислоту (100 г/л), причем при замене олеиновой кислоты на соевое или оливковое масло синтез ПАВ снижался до 5,6–6,2 г/л.

Интересными являются исследования по синтезу рамнолипидов в условиях гетерофазного культивирования (solid-state culture) [12, 13]. В качестве нерастворимых субстратов авторы использовали тростниковый жом, кукурузные кочерыжки и измельченные семечки подсолнечника. В жидкую фазу (солевой раствор) вносили глицерин или соевое масло. При культивировании *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 на среде с тростниковым жомом, измельченными семечками подсолнечника и 10 % глицерина концентрация рамнолипидов достигала 40 г/л [12], а на среде, содержащей смесь (в соотношении 1:1) тростникового жома и кукурузных кочерыжек, а также по 6 % глицерина и соевого масла – 45 г/л [13].

В работах [4, 7, 9, 11–13] авторы устанавливали эмпирически как концентрацию моносубстратов в смеси, так и собственно выбор этих субстратов. В некоторых исследованиях [9, 11] дополнительно вносимые субстраты авторы называют «предшественниками биосинтеза», что не совсем корректно, поскольку концентрация основного (масло) и вторичного (углеводы) источника углерода была одинаковой и достаточно высокой (4 %), хотя нельзя отрицать, что

манноза и эритритол могут служить предшественниками синтеза целевого продукта, каковым являются поверхностно-активные маннозилэритритоллипиды.

Отметим, что представленные в данной работе исследования по синтезу ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси гексадекана и глицерина также являются в какой-то мере эмпирическими. Ведь при культивировании на смешанных субстратах для обеспечения максимальной конверсии углерода в целевой продукт необходимо установление оптимального для его синтеза молярного соотношения концентраций моносубстратов в смеси [2]. А это в свою очередь требует проведения теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза ПАВ и биомассы на энергетически дефицитном субстрате с последующим определением концентрации энергетически избыточного субстрата, восполняющей энергетические расходы на этот процесс, как было установлено нами ранее для микробного полисахарида этаполана [2]. Для осуществления таких теоретических расчетов необходимо знать пути метаболизма соответствующих моносубстратов у продуцентов ПАВ. Такая работа с *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 нами уже начата [2], и мы надеемся в обозримом будущем успешно завершить комплекс исследований, обеспечивающих максимальную трансформацию углерода глицерина и гексадекана в поверхностно-активные вещества при культивировании штаммов ИМВ В-7241 ИМВ Ас-5017 на их смеси.

Т.П. Пироз^{1,2}, Т.А. Шевчук², А.Д. Конон¹, М.О. Шулякова¹, Г.О. Іутинська²

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 І *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017 У СЕРЕДОВИЩІ З ГЛІЦЕРИНОМ

Встановлено можливість використання як субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 гліцерину – побічного продукту виробництва біодизелю.

Максимальні показники синтезу ПАР штамом ИМВ В-7241 зафіксовані за наявності у середовищі з гліцериним дріжджового автолізу та мікроелементів. Показано можливість інтенсифікації синтезу ПАР під час культивування *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 і *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на суміші гексадекану і гліцерину у концентрації 0,5–1,0 % (об'ємна частка). За використання інокуляту, вирошеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на змішаному субстраті була на 56–100, а *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – на 260–320 % вищою, ніж на моносубстраті гліцерині.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, гліцерин, змішані субстрати.

T.P. Pirog^{1,2}, T.A. Shevchuk², A.D. Konon¹, M.A. Shulyakova¹, G.A. Iutinskaya²

¹National University of Food Technologies, Kyiv

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

SYNTHESIS OF SURFACTANTS *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 AND *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV Ас-5070 IN THE MEDIUM WITH GLYCEROL

S u m m a r y

It was established that glycerol, a byproduct of biodiesel production, may be used as substrate for synthesis of surfactants *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241.

Maximum indices of surfactants synthesis by the strain IMV B-7241 have been fixed, when the medium with glycerol included yeast autolysate and trace elements. It was shown that the surfactants synthesis could be intensified when cultivating *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 on the mixture of hexadecane and glycerol in concentration of 0.5-1.0 % (in volume). When using inoculate grown on hexadecane, the conditional concentration of the surfactant *A. calcoaceticus* IMV B-7241 on the mixed substrate was higher by 56-100, and that of *R. erythropolis* IMV Ac-5017 by 260-320 % than on the monosubstrate glycerol.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, intensification of biosynthesis, surfactants, glycerol, mixed substrates.

The author's address: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Vladimirskaya St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журн. – 2011. – **73**, № 4. – С.15–24
2. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
3. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – **27**, N 1. – P. 30–39.
4. Daverey A., Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – **79**, N 1. – P. 246–253.
5. Easterling E.R., French W.T., Hernandez R., Licha M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the grown and fatty composition of *Rhodotorula glutinis* // Biores. Technol. – 2009. – **100**, N 1. – P. 356–361.
6. Freitas F., Alves V.D., Pais J., Carvalho M., Costa N., Oliveira R., Reis M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol // Proc. Biochem. – 2010. – **45**, N 3. – P. 297–305.
7. Kim Y.B., Yun H.S., Kim E.K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture // Biores. Technol. – 2010. – **100**, N 23. – P. 6028–6032.
8. Kivisto A., Santala V., Karp M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria // Biores. Technol. – 2010. – **101**, N 22. – P. 8671–8677.
9. 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.
10. Krause F.S., Henrich A., Blombach B., Kramer R., Eikmanns B.J., Seibold G.M. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use maltose, and its applications for the improvement of L-valine productivity // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – **76**, N 1. – P. 370–374.
11. 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.
12. Neto D.C., Meira J.A., de Araujo J.M., Mitchell D.A., Krieger N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **81**, N 3. – P. 441–448.
13. Neto D.C., Bugay C., de Santana-Filho A.P., Joslin T., de Souza L.M., Sasaki G.L., Mitchell D.A., Krieger N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – **89**, N 5. – P. 1395–1403.
14. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // Appl. Biochem. Microbiol. – 2004. – **40**, N 5. P. 470–475.
15. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – **45**, N 3. P. 272–278.
16. Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T.T., Bourtoom T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plants to lipids and carotenoids // Proc. Biochem. – 2011. – **46**, N 1. – P. 210–218.
17. Wisselink H.W., Toirkens M.J., Wu Q., Pronk J.T., van Maris A.J. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – **75**, N 4. – P. 907–914
18. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – **18**, N 3. – P. 213–219.
19. Zhao Z., Kuijvenhoven K., van Gulik W.M., Heijnen J.J., van Winden W.A., Verheijen P.J.T. Cytosolic NADPH balancing in *Penicillium chrysogenum* cultivated on mixtures of glucose and ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – **89**, N 1. – P. 63–72.

Отримано 04.02.2011