

## РОЛЬ ФОСФОЕНОЛПІРУВАТКАРБОКСИЛАЗИ У СИНТЕЗІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER* *CALCOACETICUS* K-4

Встановлено, що під час культивування *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною показники синтезу поверхнево-активних речовин, активність фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилази (ферменту анаплеротичної реакції, що функціонує у мікроорганізмі за умов росту на вуглеводних субстратах), а також ферментів глікогеногенезу (ФЕП-синтетази і ФЕП-карбоксикінази) були у 1,5–3 рази вищими порівняно з використанням нітратного джерела азотного живлення.

Обговорюється фізіологічна роль ФЕП-карбоксилази у процесі вирощування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною як спосіб знешкодження вуглекислого газу, утвореного в уреазній реакції, що в свою чергу супроводжується підвищенням у клітинах бактерій пулу  $C_4$ -дикарбонових кислот, посиленням глікогеногенезу і збільшенням синтезу поверхнево-активних гліколіпідів.

**Ключові слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, поверхнево-активні речовини, етанол, сечовина, фосфоенолпіруваткарбоксилаза, анаплеротичні реакції, глікогеногенез.

Штам *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, за умов росту на етанолі синтезує поверхнево-активні речовини (ПАР), які за хімічною природою є комплексом гліко-, аміно і нейтральних ліпідів [5, 7]. Попередні дослідження були спрямовані на встановлення умов культивування продуцента, що забезпечують максимальні показники синтезу ПАР, визначення можливого практичного використання препаратів ПАР *A. calcoaceticus* K-4 для очищення довкілля від нафти та продуктів її переробки [7, 9, 10].

Дослідження особливостей  $C_2$ -метаболізму *A. calcoaceticus* K-4 [11] показало наявність у штаму ферментів, не характерних для представників роду *Acinetobacter*. До таких ферментів належать насамперед 4-нітрозо-*N,N*-діметиланілін-залежні алкоголь- і ацетальдегіддегідрогенази, піролохінолінхінон-залежна ацетальдегіддегідрогеназа, АТФ-залежна фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксикіназа і трегалозофосфатсинтаза. Виявилось несподіваним, що у процесі культивування *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі, незважаючи на наявність ферментів гліоксилатного циклу, у клітинах бактерій було виявлено достатньо високу (1600 нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білку) активність ФЕП-карбоксилази – ферменту анаплеротичного шляху, що забезпечує поповнення пулу  $C_4$ -дикарбонових кислот за умов росту мікроорганізмів на вуглеводних субстратах.

У наших попередніх працях [4, 6] було показано, що під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 – продуцента екзополісахариду етаполану на етанолі і суміші ростових  $C_2$ – $C_6$ -субстратів спостерігається висока активність як ферментів гліоксилатного циклу, так піруваткарбоксилази. Значимо, що у процесі росту на вуглеводах піруваткарбоксилаза каталізує анаплеротичну реакцію утворення оксалоацетату з пірувату, яка є незворотною [18]. До теперішнього часу в літературі є лише кілька повідомлень про здатність піруваткарбоксилази здійснювати декарбоксилювання оксалоацетату [13, 21]. Цілком ймовірно, що за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на  $C_2$ -субстратах піруваткарбоксилаза може брати участь в утворенні пірувату (наряду з оксалоацетатдекарбоксилазною реакцією).

Активність піруват- і ФЕП-карбоксилази реєстрували під час росту *Corynebacterium glutamicum* на ацетаті [22], проте фізіологічна роль цих ферментів у разі вирощування корінебактерій на  $C_2$ -субстраті залишається невідомою.

Мета даної роботи – визначення ролі ФЕП-карбоксилази для росту і синтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі.

**Матеріали і методи.** Штам *A. calcoaceticus* K-4 депонований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером ІМВ В-7241.

*A. calcoaceticus* K-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі Мюнца [3] (г/л):  $KNO_3$  – 1,0;  $NaCl$  – 1,0;  $Na_2HPO_4$  – 0,6;  $KH_2PO_4$  – 0,14;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,1, рН 6,8–7,0. В одно-

му з варіантів нітрат калію у середовищі було замінено на еквімолярні за азотом концентрації  $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  і  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 1–2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з середини експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % етанолу. Кількість інокуляту – 5 % від об'єму середовища ( $10^4$ – $10^5$  клітин/мл). Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °C упродовж 48–120 год.

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху вагу клітин за калібрувальним графіком. 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 раніше [7].

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* K-4 на рідкому середовищі з етанолом, центрифугували (5000 g, 20 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 °C), осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1), ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31), ФЕП-синтетази (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) визначали як описано у праці [11]. Під час дослідження впливу катіонів калію, натрію і амонію на активність ізоцитратліази і ФЕП-карбоксилази відмивання клітин, ультразвукову обробку і визначення активності ферментів здійснювали у 0,05 М трис-фосфатному буфері (рН 7,0). Концентрація катіонів у реакційній суміші становила 25, 50 і 100 мМ. Катіони вносили у реакційну суміш у вигляді 20 %-вих розчинів  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  і  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [16].

Активність ферментів аналізували при 28–30 °C – температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* K-4.

Всі досліди проводили у трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від трьох до п'яти. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали як описано у роботі [2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** У попередніх дослідженнях з оптимізації умов культивування *A. calcoaceticus* K-4 було встановлено, що найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися за використанням як джерела азоту сечовини [7]. Тому на першому етапі аналізували активність ферментів анаплеротичних шляхів за умов росту штаму K-4 на вихідному середовищі Мюнца і модифікованому нами середовищі, в якому нітрат калію було замінено на еквімолярну за азотом концентрацію сечовини (табл. 1). Як видно з наведених у табл. 1 даних, активність ізоцитратліази (ключового ферменту гліоксилатного циклу) залишалася практично на одному й тому самому рівні незалежно від природи джерела азотного живлення у середовищі культивування *A. calcoaceticus* K-4, у той час як активність ФЕП-карбоксилази підвищувалася у 2,5 рази за умов росту штаму K-4 на середовищі з сечовиною. Зазначимо, що збільшення активності ФЕП-карбоксилази корелювало з підвищенням показників синтезу ПАР (табл. 1). Так, під час культивування штаму K-4 на модифікованому нами середовищі умовна концентрація ПАР була у 2, а індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини – у 1,5 рази вищими порівняно з вирощуванням бактерій на вихідному середовищі Мюнца.

Ми припустили, що однією з причин зниження активності ФЕП-карбоксилази у процесі культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з  $\text{KNO}_3$  може бути інгібування активності цього ферменту катіонами калію. У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували вплив одновалентних катіонів на активність ФЕП-карбоксилази та ізоцитратліази (табл. 2). Одержані експериментальні результати не підтвердили нашого припущення: за присутності до-

сліджуваних концентрацій  $K^+$  активність ФЕП-карбоксилази практично не змінювалася. Проте катіони натрію і амонію виявилися активаторами цього ферменту: за присутності у реакційній суміші 25 мМ  $NH_4^+$  або 100 мМ  $Na^+$  ФЕП-карбоксилазна активність підвищувалася в 1,2–1,3 рази. Зазначимо, що досліджувані концентрації одновалентних катіонів практично не впливали на активність іншого анаплеротичного ферменту – ізоцитратліази (табл. 2).

У табл. 2 наведено дані щодо впливу катіонів калію, натрію та амонію на активність ФЕП-карбоксилази та ізоцитратліази у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин *A. calcoaceticus* К-4, вирощених на вихідному середовищі Мюнца. Подальші дослідження показали, що практично такі самі закономірності спостерігаються й у разі культивування бактерій на середовищі з сечовиною: катіони калію не впливають на активність ФЕП-карбоксилази, а катіони натрію (100 мМ) і амонію (25 мМ) підвищують активність цього ферменту в 1,2–1,4 рази.

Таблиця 1

**Вплив природи джерела азоту у середовищі культивування *A. calcoaceticus* К-4 на показники росту і синтезу ПАР та активність ферментів анаплеротичних шляхів**

Джерело азоту у середовищі	Біомаса, г/л	Умовна концентрація ПАР	Індекс емульгування, $E_{24}$ (%)	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)	
				ізоцитратліази	ФЕП-карбоксилази
$KNO_3$	1,3 ± 0,06	2,0 ± 0,1	40±2	576±25	660±33
$(NH_4)_2CO$	1,6 ± 0,08	4,0 ± 0,2	60±3	588±27	1660±78

**Примітки.** Концентрація етанолу у середовищі культивування 2 %, тривалість культивування 120 год. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, що перебували у середині експоненційної фази росту (48 год).

Таблиця 2

**Зміна активності ферментів анаплеротичних шляхів за присутності одновалентних катіонів**

Ферменти	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білку) за присутності у реакційній суміші									
	Без катіонів	$K^+$ , мМ			$NH_4^+$ , мМ			$Na^+$ , мМ		
		25	50	100	25	50	100	25	50	100
ФЕП-карбоксилаза	660±33	694±35	646±32	646±32	833±42	756±38	660±33	717±36	772±38	794±39
Ізоцитратліаза	576±25	513±21	Н.в.	556±28	504±25	556±28	Н.в.	556±28	556±28	Н.в.

**Примітка.** Активність визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, що перебували у середині експоненційної фази росту (48 год.). Культивування здійснювали на середовищі Мюнца (з нітратом калію). Концентрація етанолу у середовищі 1 %. «Н.в.» - не визначали.

Отже, можна сподіватися, що заміна у середовищі Мюнца нітрату калію на еквімолярні за азотом концентрації нітрату натрію або амонійних солей супроводжуватиметься підвищенням як активності ФЕП-карбоксилази, так і показників синтезу ПАР. Наші попередні дослідження [8] показали, що за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на середовищі з нітратом натрію показники синтезу ПАР підвищувалися у 1,5–2 рази. Такий ефект від заміни у середовищі культивування нітрату калію на нітрат натрію був зумовлений тим, що катіони натрію є активатором, а катіони калію – інгібітором алкангидроксилази – першого ферменту окиснення *n*-гексадекану у штаму ЕК-1.

Показники росту і синтезу ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з різними джерелами азоту наведено у табл. 3. Одержані результати виявилися неочікуваними: за присутності у середовищі культивування бактерій амонійних солей рівень біомаси і умовна концентрація ПАР були у 2–2,7 і 2,9–5,7 разів нижчими порівняно з показниками на середовищі з нітратом калію і сечовиною відповідно. За таких умов культивування штаму K-4 суттєво (у 3–6 разів) знижувався й індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини (табл. 3). Зазначимо, що на відміну від *R. erythropolis* EK-1 [8] заміна нітрату калію на нітрат натрію не впливала на показники синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4, хоча катіони натрію виявилися активаторами ФЕП-карбоксилази (див. табл. 2). Дослідження впливу катіонів на активність ключових ферментів C<sub>2</sub>-метаболізму у штаму K-4 буде предметом наших подальших досліджень.

Суттєва різниця у концентрації біомаси і ПАР під час культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з амонійним і аміним джерелами азоту є досить дивною, оскільки відомо, що у клітинах бактерій всі використовувані джерела азотного живлення (молекулярний азот, амоній, нітрат, нітрит, органічний азот) спочатку відновлюються до іонів амонію і тільки після цього використовуються у процесах асиміляційної нітратредукції [1, 12]. Одержані нами результати дали змогу припустити, що у *A. calcoaceticus* K-4 існують певні проблеми з транспортом іонів амонію у клітини (на відміну від транспорту амінного азоту). Вияснення цього питання потребує додаткових досліджень.

Таблиця 3

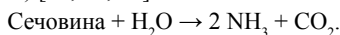
Показники росту і синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4 залежно від природи джерела азотного живлення

Джерело азоту у середовищі	Біомаса, г/л	Умовна концентрація ПАР	Індекс емульгування, E <sub>24</sub> (%)
KNO <sub>3</sub>	1,3 ± 0,06	2,0 ± 0,1	40±2
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	1,6 ± 0,08	4,0 ± 0,2	60±3
NaNO <sub>3</sub>	1,2 ± 0,06	2,1 ± 0,1	37±2
NH <sub>4</sub> Cl	0,6 ± 0,03	0,7 ± 0,04	13±0,6
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,6 ± 0,03	0,8 ± 0,04	10±0,5

**Примітки.** Концентрація етанолу у середовищі культивування 2 %, тривалість культивування 120 год. Концентрації джерел азотного живлення еквімолярні за азотом.

Наступні експерименти були спрямовані на встановлення механізмів, що забезпечують підвищення рівня синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4 за використання сечовини як джерела азотного живлення.

Відомо, що сечовина у клітинах мікроорганізмів гідролізується до іонів амонію і CO<sub>2</sub> під дією ферменту уреазы (КФ 3.5.1.5) [15, 17, 19]:



Отже, уреазна реакція, в результаті якої утворюється вуглекислий газ, супроводжується підвищенням внутрішньоклітинної концентрації CO<sub>2</sub>, що, в свою чергу, може призвести до отруєння клітин і інгібування їхнього росту. Цілком ймовірно, що фізіологічна роль ФЕП-карбоксилази за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з сечовиною полягає у знешкодженні високих концентрацій вуглекислого газу, утворюваного під час гідролізу сечовини, тобто ФЕП-карбоксилазна реакція є своєрідним стоком надлишкового CO<sub>2</sub> у клітинах цих бактерій.

Зазначимо, що в результаті функціонування ФЕП-карбоксилазної реакції не тільки знижується концентрація вуглекислого газу, а й підвищується вміст C<sub>4</sub>-дикарбонових кислот, які є попередниками глюконеогенезу. Отже, фізіологічне значення цього ферменту під час культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною може полягати також у посиленні глюконеогенезу, а отже й підвищенні синтезу поверхнево-активних гліколіпідів. Підтвердженням цьому стали результати дослідження активності ферментів глюконеогенезу за умов росту штаму K-4 на середовищі з сечовиною і нітратом калію (табл. 4). Раніше нами було встановлено, що за умов росту штаму K-4 на етанолі у синтезі вуглеводів, необ-

хідних для конструктивного метаболізму, беруть участь обидва ключові ферменти глюконеогенезу – ФЕП-синтетаза і АТФ-залежна ФЕП-карбоксикіназа [11]. Як видно з наведених у табл. 4 даних, активність як ФЕП-синтетази, так і ФЕП-карбоксикінази у процесі вирощування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з сечовиною є у 2–2,7 разів вищою порівняно з використанням нітратного джерела азоту. Підвищення активності ферментів глюконеогенезу за умов росту штаму K-4 на середовищі з сечовиною корелює з активністю ФЕП-карбоксилази і рівнем синтезу ПАР (див. табл. 1).

Таблиця 4

Активність ферментів глюконеогенезу за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з різними джерелами азоту

Джерело азоту у середовищі	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)	
	ФЕП-синтетази	ФЕП-карбоксикінази
KNO <sub>3</sub>	2173±108	450±22
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO	4400±170	1209±58

**Примітка.** Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, що перебували на початку експоненційної фази росту (24 год). Концентрація етанолу у середовищі 1 %.

Літературні дані також засвідчують, що найвищі показники синтезу емульсану (високомолекулярного позаклітинного емульгатора ліпополісахаридно-білкової природи, синтезованого *Acinetobacter venetianus* RAG-1 на етанолі) також спостерігаються за використання сечовини як джерела азотного живлення [14, 20].

Отже, наведені експериментальні дані можуть свідчити про те, що за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною ФЕП-карбоксилазна реакція виконує такі функції: по-перше, забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації вуглекислого газу, утворюваного в уреазній реакції, до безпечного рівня і тим самим унеможливорює отруєння клітин CO<sub>2</sub>; по-друге, приводить до посилення глюконеогенезу і підвищення рівня синтезу поверхнево-активних гліколіпідів. Функціонування ФЕП-карбоксилазної реакції в клітинах *A. calcoaceticus* K-4 за використання інших, відмінних від сечовини, джерел азотного живлення є одним із механізмів, що забезпечують достатньо високий рівень синтезу поверхнево-активних речовин гліколіпідної природи.

*Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Е.Ю. Долошенко*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна*

## РОЛЬ ФОСФОЕНОЛПИРУВАТКАРБОКСИЛАЗЫ В СИНТЕЗЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4

### Резюме

Установлено, что при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на среде с этанолом и мочевиной показатели синтеза поверхностно-активных веществ, активность фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксилазы (фермента анаплеротической реакции, функционирующей у микроорганизмов при росте на углеводных субстратах), а также ферментов глюконеогенеза (ФЕП-синтетази и ФЕП-карбоксикиназы) были в 1,5–3 раза выше по сравнению с использованием нитратного источника азотного питания. Обсуждается физиологическая роль ФЕП-карбоксилазы при выращивании *A. calcoaceticus* K-4 на среде с этанолом и мочевиной как способ обезвреживания углекислого газа, образующегося в уреазной реакции, что в свою очередь сопровождается повышением в клетках бактерий пула C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот, усилением глюконеогенеза и увеличением синтеза поверхностно-активных гликолипидов.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, поверхностно-активные вещества, этанол, мочевина, фосфоенолпируваткарбоксилаза, анаплеротические реакции, глюконеогенез.

## ROLE OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE IN SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4

### S u m m a r y

It has been established that under cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* K4 on the medium with ethanol and urea the indices of surfactants synthesis, activity of phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (enzyme of anaplerotic reaction functioning in microorganisms under growth on carbohydrate substrates), as well as the enzymes of gluconeogenesis (PEP-synthetase and PEP carboxykinase) were 1.5-3 times higher as compared with the use of nitrate source of nitrogen nutrition. Physiological part of PEP-carboxylase when growing *A. calcoaceticus* K-4 on the medium with ethanol and urea is discussed as a method of neutralization of carbon dioxide by increasing a pool of C<sub>4</sub>-dicarbonic acids in the bacterial cells, by intensification of gluconeogenesis and synthesis of surface-active glycolipids.

The paper is presented in Ukrainian.

**K e y w o r d s:** *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, biosurfactants, ethanol, urea, phosphoenolpyruvate carboxylase, anaplerotic reactions, gluconeogenesis.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Pirog T.P., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 303 с.
4. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Микробиология. – 2003. – 72, № 4. – С. 459–465.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеекисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С. 58–63.
6. Пирог Т.П., Лацук Н.В., Корж Ю.В. Регуляція C<sub>2</sub>-метаболізму в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші етанолу і глюкози // Мікробіол. журнал. – 2006. – 68, № 1. – С. 21–32.
7. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – 45, № 3. – С. 304–310.
8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.О. Особливості окиснення алканів у *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. – 2009. – 71, № 4. – С. 9–13.
9. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокіна А.І. Вплив поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на ефективність мікробної деструкції нафтових забруднень // Мікробіол. журнал. – 2009. – 71, № 5. – С. 8–13.
10. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокіна А.І. Біодеструкція поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Мікробіол. журнал. – 2010. – 72, № 1. – С. 28–33.
11. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугінець О.С. Особливості окиснення етанолу у *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 – продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. – 2010. – 72, № 6. – С. 3–10.
12. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрвеса, Г. Шлегеля. – Т. 1. – М.: Мир, 2005. – 654 с.
13. Attwood P.V., Cleland W.W. Decarboxylation of oxaloacetate by pyruvate carboxylase // Biochemistry. – 1986. – 25, N 25. – P. 8191–8196.
14. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69, N 5. – P. 2608–2615.
15. Belzer C., Stoof J., Beckwith C.S., Kuipers E. J., Kusters J.G., van Vliet A.H. Differential regulation of urease activity in *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* // Microbiology. – 2005. – 151, N 12. – P. 3989–3995.
16. 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 1–2. – P.248–254.
17. Geweely N.S.I. Purification and characterization of intracellular urease enzyme isolated from *Rhizopus oryzae* // Biotechnology. – 2006. – 5, N 3. – P. 358–364.

18. Jitrapakdee S., Wallace J.C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase // Biochem. J. – 1999. – **340**, N 1. – P.1–16.
19. Mobely H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P. Molecular biology of microbial urease // Microbiol. Rev. – 1995. – **59**, N 3. – P. 451–479.
20. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 1. – P. 154–162.
21. Scrutton M.C., Utter M.F. Pyruvate carboxylase. III. Some physical and chemical properties of the highly purified enzyme // J. Biol. Chem. – 1965. – **240**, N 1. – P. 1–9.
22. Wendish V.F., de Graaf A.A., Sahn H., Eikmanns B.J. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose // J. Bacteriol. – 2000. – **182**, N 11. – P. 3088–3096.

Отримано 11.10.2010

УДК 759.873.088.5:661.185

**Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Н.А. Гриценко<sup>1</sup>, Д.И. Хомяк<sup>1</sup>, А.Д. Конон<sup>1</sup>, С.И. Антонюк<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий,  
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

## **ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* К-8 ПРИ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ**

*Селекционирован штамм бактерий Nocardia vaccinii К-8 – продуцент поверхностно-активных веществ (ПАВ) на глицерине (побочный продукт производства биодизеля из растительных масел и животных жиров).*

*С помощью однофакторных экспериментов и математических методов планирования оптимизирован состав питательной среды, обеспечивающий максимальные показатели синтеза ПАВ N. vaccinii К-8 (0,5 г/л NaNO<sub>3</sub>, 0,3 г/л дрожжевого экстракта и 1,5 % глицерина).*

*По химическому составу ПАВ, синтезированные N. vaccinii К-8 на глицерине, являются комплексом нейтральных, глико- и аминоклидов. Нейтральные липиды представлены миколовыми и n-алкановыми кислотами, гликолипиды – трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами. Одновременное внесение в среду с глицерином 0,2 % фумарата (предшественник глюконеогенеза) и 0,2 % цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста штамма К-8 сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 40 % по сравнению с культивированием бактерий на среде без органических кислот.*

*Ключевые слова: бактерии рода Nocardia, поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, отходы производства биодизеля.*

Глицерин – простой спирт (1,2,3-пропантриол), является одним из основных продуктов трансэтерификации растительных масел и животных жиров [6, 17]. На сегодняшний день этот спирт в огромных количествах образуется при производстве биодизеля в качестве побочного продукта технологии, и с каждым годом его накапливается все больше и больше [4, 6, 17]. Отметим, что на каждые 100 л биодизеля образуется приблизительно столько же технического глицерина. Только за период с 2004 по 2006 год цена на глицерин снизилась более чем в 10 раз. Известные потребители глицерина – парфюмерно-косметическая промышленность, военно-промышленный комплекс – не способны обеспечить достаточный уровень его утилизации [17]. Поэтому необходим поиск альтернативных путей решения этой проблемы.

Некоторые стратегии базируются на химической и биологической переработке глицерина. Биологическая модификация позволяет обойти недостатки химического катализа (низкая специфичность, использование высокого давления и температуры), производя при этом огромное количество разнообразных практически ценных продуктов, в том числе и микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В последние годы микробные ПАВ являются объектом интенсивных теоретических и прикладных исследований, что обусловлено их возможным практическим использованием в

© Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко, Д.И. Хомяк, А.Д. Конон, С.И. Антонюк, 2011