

THE EFFECT OF MONOSUBSTRATES MOLAR RATIO CONCENTRATIONS IN MIXTURE ON SYNTHESIS OF 'ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4 BIOSURFACTANTES

I. Bilets, A. Konon, T. Pirog
National University of Food Technologies

Key words:	ABSTRACT
Surface active substances <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K-4 Intensification of biosynthesis Energy nonequivalent growth substrates Molar ratio	It was established that synthesis of surface-active substances depends on the molar ratio of monosubstrates under <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K-4 cultivation on mixture of energy excess (hexadecane) and energy deficient (glycerol, glucose, ethanol) substrates. Indexes of the production of the surface-active substances on mixture of hexadecane and ethanol, hexadecane and glucose, hexadecane and glycerol with molar ratio 1:1, 1:1, 1: 6 respectively increased by 1,3 – 4,8 times compared with bacteria's growth on energy deficient monosubstrates.
Article history: Received 20.12.2012 Received in revised form 15.01.2013 Accepted 18.01.2013	
Corresponding author: E-mail: npnuht@ukr.net	

ВПЛИВ МОЛЯРНОГО СПІВВІДНОШЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ МОНОСУБСТРАТІВ У СУМІШІ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН 'ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4

І.В. Білець, А.Д. Конон, Т.П. Пирог
Національний університет харчових технологій

Встановлено залежність синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus K-4 на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (гліцерин, глюкоза, етанол) субстратів від молярного співвідношення їх концентрацій у суміші. Показники синтезу ПАР на суміші гексадекану й етанолу, гексадекану і глюкози, гексадекану і гліцерину у молярному співвідношенні 1:1, 1:1, 1:6 відповідно були в 1,3 – 4,8 разів вищими порівняно з культивуванням бактерій на відповідних енергетично дефіцитних моносубстратах.

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, Acinetobacter calcoaceticus K-4, інтенсифікація біосинтезу, енергетично нерівноцінні ростові субстрати, молярне співвідношення*

Одним із шляхів удосконалення технологій мікробного синтезу є використання суміші ростових субстратів для культивування продуцентів. Такий підхід дає змогу уникнути

непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце за використання моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у вторинні метаболіти [3, 4].

У наших попередніх дослідженнях було встановлено можливість інтенсифікації синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів (енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитних гліцерину, глюкози, етанолу) [2]. У ході досліджень було показано залежність ефективності біосинтезу від природи джерела вуглецю в середовищі для одержання інокуляту та від концентрації субстратів у суміші. Проте варто зазначити, що синтез ПАР на змішаних субстратах може залежати не лише від загального вмісту моносубстратів, а й від молярного співвідношення їх концентрацій у суміші [5, 6].

У праці [6] показано, що синтез рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* SP4 на пальмовій олії за внесення глюкози як допоміжного субстрату був найвищим за співвідношення концентрацій гідрофобного і гідрофільного джерел вуглецю 40:1. Подальше підвищення вмісту вуглецю у суміші не давало позитивного ефекту, більш того, за високих концентрацій глюкози інгібувала споживання гідрофобного субстрату. Інші дослідники [5] показали, що для синтезу софороліпідів оптимальним субстратом була суміш меляси (50 г/л) і соєвої олії (50 г/л). Проте це не дає підстав вважати оптимальним співвідношення концентрацій моносубстратів 1:1, оскільки за підвищення вмісту меляси до 100 і 150 г/л відповідно спостерігали зниження показників синтезу ПАР [5].

Аналогічне явище мало місце і в наших попередніх дослідженнях [2]. У міру підвищення концентрацій моносубстратів у суміші спостерігали зниження показників синтезу ПАР *A. calcoaceticus* К-4, хоча незалежно від концентрацій на змішаних субстратах умовна концентрація ПАР була в 1,3 – 4 рази вищою, ніж на відповідних моносубстратах.

Мета даної роботи — визначення оптимального для синтезу ПАР *A. calcoaceticus* К-4 молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних моносубстратів у суміші.

Штам *A. calcoaceticus* К-4, ізолюваний нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером ІМВ В-7241.

Культивування *A. calcoaceticus* К-4 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaCl — 1,0; Na₂HPO₄ — 0,6; (NH₂)₂CO — 0,35; MgSO₄×7H₂O — 0,1; KH₂PO₄ — 0,14; рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів [1] — 0,1 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю та енергії використовували:

- суміш гексадекану (0,5 %, об'ємна частка) та гліцерину (0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 %, об'ємна частка) у молярному співвідношенні 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7 відповідно;
- суміш гексадекану (0,5 %, об'ємна частка) та глюкози (0,24; 0,48; 0,72; 1,2; 1,7 %, масова частка) у молярному співвідношенні 1:1; 1:2; 1:3; 1:5; 1:7 відповідно;
- суміш гексадекану (0,5 %, об'ємна частка) й етанолу (0,1; 0,23; 0,31; 0,4; 0,5; 0,54 %, об'ємна частка) у молярному співвідношенні 1:1; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6,5; 1:7 відповідно;
- моносубстрати гексадекан, етанол, глюкоза, гліцерин в концентраціях, еквімолярних за вуглецем концентраціям відповідних змішаних субстратів.

Необхідного молярного співвідношення субстратів досягали, змінюючи концентрацію глюкози, етанолу, гліцерину за незмінної концентрації гексадекану.

Посівним матеріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* К-4 з експоненційної фази росту, вирощена на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами вуглецю в середовищі для одержання інокуляту були моносубстрати гексадекан, гліцерин, етанол, глюкоза у концентрації 0,5 %, а також суміш глюкози і гексадекану; етанолу і гексадекану у концентрації 0,25 % кожного з субстратів. Для кожного з варіантів змішаного субстрату використовували інокулят, вирощений на середовищі з оптимальним джерелом вуглецю

[2]. Концентрація посівного матеріалу ($10^4 - 10^5$ клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) упродовж 120 год при 30 °С.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР*, індекс емульгування E_{24} , %) визначали як описано у праці [1]. Для оцінки ефективності синтезу ПАР використовували також показники умовного виходу ПАР від біомаси та від субстрату. Умовний вихід ПАР по відношенню до біомаси визначали як відношення умовної концентрації ПАР до рівня біомаси та позначали ПАР*/г біомаси. Умовний вихід ПАР від субстрату визначали як відношення показника ПАР* до вмісту вуглецю в середовищі та позначали ПАР*/г С, де г С — це кількість вуглецю в змішаному або моносубстраті.

Оскільки у попередніх дослідженнях [2] показники синтезу ПАР *A. calcoaceticus* К-4 були найвищими за концентрації кожного з моносубстратів у суміші 0,5 %, ці концентрації енергетично нерівноцінних субстратів були обрані нами як базові для визначення їх оптимального молярного співвідношення. Розрахунки показали, що за таких концентрацій гексадекану і гліцерину молярне співвідношення цих субстратів у суміші становить 1:5,2, гексадекану і глюкози — 1:2,2, гексадекану й етанолу — 1:6,5.

Експерименти показали, що показники синтезу ПАР корелювали зі зміною молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів у суміші. Як видно з даних, наведених у табл. 1, найвищі показники синтезу ПАР за умов росту продуцента на суміші гексадекану й етанолу спостерігалися за молярного співвідношення концентрацій гідрофобного і гідрофільного джерел вуглецю 1:1. У міру підвищення концентрації етанолу у змішаному субстраті поступово знижувався умовний вихід ПАР від субстрату та біомаси, досягаючи найнижчих значень (0,79 ПАР*/г С і 2,3 ПАР*/г біомаси відповідно) за молярного співвідношення концентрацій гексадекану й етанолу 1:7. У цьому разі індекс емульгування культуральної рідини також був мінімальним (40 %).

Наступні експерименти показали, що оптимальним молярним співвідношенням концентрацій гексадекану і глюкози у суміші також виявилось співвідношення 1:1 (табл. 1). Зазначимо, що максимальне значення умовної концентрації ПАР (3,2) було зафіксовано за молярного співвідношення концентрацій гексадекану і глюкози 1:2, проте різниця між значенням цього показника за співвідношення моносубстратів 1:1 та 1:2 виявилася статистично недостовірною. У той же час умовний вихід ПАР від субстрату і біомаси (0,86 ПАР*/г С і 2,3 ПАР*/г біомаси відповідно) був найвищим за молярного співвідношення гексадекану і глюкози 1:1. Так само, як і за умов росту *A. calcoaceticus* К-4 на суміші гексадекану й етанолу, під час культивування бактерій на суміші гексадекану і глюкози підвищення концентрації у суміші гідрофільного джерела вуглецю супроводжувалося зниженням усіх досліджуваних показників синтезу ПАР. Зазначимо, що незалежно від молярного співвідношення концентрацій гексадекану і глюкози індекс емульгування культуральної рідини суттєво не змінювався і становив 50 – 52 % (табл. 1).

Інші закономірності спостерігалися у процесі вирощування *A. calcoaceticus* К-4 на суміші гексадекану і гліцерину. У міру збільшення молярного співвідношення концентрацій гідрофобного і гідрофільного субстратів від 1:3 до 1:6 спостерігали поступове підвищення умовної концентрації ПАР від 2,8 до 4,3, індексу емульгування — від 46 до 52 %, а умовного виходу ПАР від біомаси — від 1,6 до 2,9 ПАР*/г біомаси (табл. 1). За молярного співвідношення концентрацій гексадекану і гліцерину 1:7 усі показники синтезу ПАР знижувалися.

Наведені у табл. 2 дані щодо відносного збільшення показників синтезу поверхнево-активних речовин у процесі культивування пштаму К-4 на змішаних субстратах засвідчують, що за використання суміші гексадекану й етанолу, гексадекану і глюкози, гексадекану і гліцерину у молярному співвідношенні 1:1, 1:1 та 1:6 відповідно умовна концентрація ПАР зростала на 27 – 480, умовний вихід ПАР від субстрату — на 26 – 492, а умовний вихід ПАР від біомаси — на 16 – 212 % порівняно з культивуванням бактерій на відповідних енергетично дефіцитних моносубстратах.

МІКРОБІОЛОГІЯ

Таблиця 1. Синтез ПАР *A. calcoaceticus* K-4 за різного молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші

Субстрат	Молярне співвідношення субстратів у суміші	Показники синтезу ПАР			
		ПАР *	E ₂₄ , %	Умовний вихід ПАР від субстрату, ПАР*/г С	Умовний вихід ПАР від біомаси, ПАР*/г біомаси
Гексадекан + етанол	1:1	4,2±0,20	44±2,4	1,46±0,07	3,2±0,15
	1:3	3,5±0,17	45±2,5	0,99±0,05	3,2±0,15
	1:4	3,6±0,18	44±2,4	0,95±0,05	2,3±0,11
	1:5	4,0±0,20	47±2,5	0,97±0,05	2,6±0,13
	1:6,5	3,8±0,19	40±2,0	0,83±0,04	2,9±0,14
	1:7	3,8±0,19	40±2,0	0,79±0,03	2,3±0,11
Гексадекан + глюкоза	1:1	3,0±0,15	50±2,5	0,86±0,04	2,3±0,11
	1:2	3,2±0,16	50±2,5	0,72±0,03	2,0±0,10
	1:3	2,8±0,14	52±2,6	0,52±0,02	2,0±0,10
	1:5	2,4±0,12	52±2,6	0,33±0,01	1,7±0,08
	1:7	2,1±0,10	50±2,5	0,23±0,01	1,4±0,07
Гексадекан + гліцерин	1:3	2,8±0,14	46±2,5	0,76±0,03	1,6±0,08
	1:4	3,8±0,18	40±2,5	0,85±0,04	2,3±0,11
	1:5	4,0±0,20	47±2,4	0,81±0,04	2,8±0,14
	1:6	4,3±0,20	52±2,6	0,80±0,04	2,9±0,14
	1:7	4,0±0,20	33±1,8	0,68±0,03	2,4±0,12

Примітка. Під час культивування штаму K-4 на суміші гексадекану і глюкози, гексадекану і етанолу інокулянт вирощували на відповідних змішаних субстратах, за умов росту бактерій на суміші гексадекану і гліцерину посівний матеріал вирощений на гексадекані г С — вміст вуглецю в субстраті

Таблиця 2. Відносне збільшення показників синтезу ПАР за умов росту *calcoaceticus* K-4 на змішаних субстратах

Змішаний субстрат	Молярне співвідношення субстратів у суміші	Показники синтезу ПАР		
		ПАР*, % від контролю	ПАР*/г С, % від контролю	ПАР*/г біомаси, % від контролю
Гексадекан + етанол	1:1	27±1,4	25,9±1,3	16,3±0,8
Гексадекан + глюкоза	1:1	480±24	492±24	139±7
Гексадекан + гліцерин	1:6	375±19	366±18	212±10

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу на відповідних енергетично-дефіцитних субстратах, в яких концентрація вуглецю еквімолярна концентрації змішаного субстрату.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, найменш «ефективним» змішаним ростовим субстратом виявилася суміш гексадекану й етанолу, оскільки за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на такому субстраті показники синтезу ПАР підвищувалися незначно (на 16 – 27 %) порівняно з такими на етанолі. Разом з тим, наведені дані засвідчують залежність синтезу поверхнево-активних речовин штамом K-4 від молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші.

Варто зазначити, що ми не можемо однозначно трактувати отримані дані щодо оптимальних для синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4 молярних співвідношень концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів у суміші. Причин цьому кілька.

По-перше, у разі зміни молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у середовищі суттєво змінювалося співвідношення вуглець/азот, а ефективність синтезу поверхнево-активних речовин (як і інших вторинних метаболітів) суттєво залежить від значення цього показника.

По-друге, у дослідженнях, присвячених утворенню ПАР *A. calcoaceticus* K-4 на суміші субстратів, як основний показник синтезу поверхнево-активних речовин ми використовували умовну концентрацію ПАР. Під час проведення великої серії експериментальних досліджень визначення ПАР* є оправданим, оскільки цей експрес-метод дає змогу досить

швидко (упродовж 10 – 20 хв) оцінити ефективність процесу біосинтезу. Проте коректнішим є визначення кількості синтезованих ПАР ваговим методом після екстракції сумішню Фолча з супернатанту культуральної рідини. Як показали попередні дослідження, не завжди спостерігається чітка кореляція між цими двома показниками.

По-третє, під час досліджень синтезу ПАР на суміші субстратів *A. calcoaceticus* К-4 вирощували на середовищі, склад якого був оптимізований для етанолу як джерела вуглецю і енергії [1]. Не виключено, що за умов росту на інших як моно-, так і змішаних субстратах вимоги до складу поживного середовища виявляться іншими. Це насамперед стосується наявності у середовищі культивування штаму К-4 дріжджового автолізу та мікроелементів. Як показали попередні дослідження (неопубліковані дані), у процесі вирощування *A. calcoaceticus* К-4 на середовищі з гліцерином іони заліза інгібують синтез ПАР. Крім того, показники синтезу поверхнево-активних речовин на цьому субстраті знижувалися у разі використання інокуляту, вирощеного на середовищі з дріжджовим автолизатом і мікроелементами, порівняно із застосуванням посівного матеріалу, вирощеного на середовищі без факторів росту.

По-четверте, для коректного визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій ростових субстратів у суміші необхідне здійснення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті з наступним визначенням концентрації енергетично надлишкового субстрату, що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес. Проведення ж теоретичних розрахунків передбачає знання шляхів метаболізму відповідних моносубстратів у продуцента ПАР.

Так, у попередніх дослідженнях [3] нами було показано, що синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші енергетично нерівноцінних C_2 – C_6 -субстратів залежав від способу підготовки посівного матеріалу, молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші, співвідношення вуглець/азот у середовищі культивування. Наприклад, за умов росту продуцента етаполану на суміші фумарату і глюкози максимальні показники синтезу цього полісахариду спостерігалися у разі використання інокуляту, вирощеного на глюкозі, молярного співвідношення фумарату і глюкози 4:1 і співвідношенні вуглець/азот, що дорівнював 70,5.

Це свідчить про необхідність проведення подальших досліджень зі встановлення оптимальних умов синтезу ПАР *A. calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів.

Висновок

У результаті проведеної роботи встановлено, що за умов росту *A. calcoaceticus* К-4 на змішаних ростових субстратах ефективність синтезу поверхнево-активних речовин залежить від молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші. Показано, що використання суміші енергетично надлишкового гексадекану та енергетично дефіцитних глюкози, етанолу і гліцерину в молярних співвідношеннях 1:1, 1:1, 1:6 відповідно дає змогу на 27 – 480 % підвищити умовну концентрацію ПАР порівняно з використанням енергетично дефіцитних моносубстратів.

Література

1. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 304 – 310.
2. Пирог Т.П., Білець І.В., Конон А.Д. Синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів // Наукові праці НУХТ. — 2010 (у друці).
3. Пирог Т.П., Конон А.Д. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу практично важливих вторинних метаболітів // Наукові праці НУХТ. — 2010. — № 33. — С. 32 – 35.
4. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. — 1985. — V. 131, N 1. — P. 39 – 45.

5. Daverey A., Pakshirajan K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — V. 160. — P. 2090 – 2101.

6. Pansiripat S., Pornsunthorntawe O., Rujiravanit R., Kitiyanan B., Somboonthanate P., Chavadej S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil-to-glucose ratio // Biochem. Engen. J. — 2010. — V. 49. — P. 185 – 191.

ВЛИЯНИЕ МОЛЯРНОГО СООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ МОНОСУБСТРАТОВ В СМЕСИ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4

И.В. Билец, А.Д. Конон, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

*Установлена зависимость синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на смеси энергетически избыточного (гексадекан) и энергетически дефицитных (глицерин, глюкоза, этанол) субстратов от молярного соотношения их концентраций в смеси. Показатели синтеза ПАВ на смеси гексадекана и этанола, гексадекана и глюкозы, гексадекана и глицерина в молярном соотношении 1:1, 1:1, 1:6 соответственно были в 1,3 – 4,8 раза выше, по сравнению с культивированием бактерий на соответствующих энергетически дефицитных моносубстратах.*

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, интенсификация биосинтеза, энергетически неравноценны ростовые субстраты, молярное соотношение*