

УДК 759.873.088.5:661.185

## СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 НА ЭТАНОЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

© 2012 г. Т. П. Пирог\*, Т. А. Шевчук\*, А. Д. Конон\*\*, Е. Ю. Долотенко\*\*

\*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

\*\*Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Поступила в редакцию 19.09.2011 г.

Изучено влияние фумарата ( $C_4$ -дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов) на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на этаноле. Установлено, что одновременное внесение фумарата и цитрата (0.01–0.02%) в конце экспоненциальной фазы роста штамма К-4 на среде с этанолом (2% по объему) сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ\* на 45–55% по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот.

Повышение синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата обусловлено увеличением в 1.7–7 раз активности ферментов биосинтеза гликолипидов (фосфоенолпируватсинтетаза и трегалозофосфатсинтаза) и аминоклипидов (НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа), а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатный цикл и фосфоенолпируваткарбоксилазная реакция).

В предыдущих исследованиях нами было показано, что штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, изолированный из загрязненных нефтью образцов почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества (ПАВ) при выращивании на гидрофильных и гидрофобных субстратах [1]. Установлены условия культивирования штамма К-4 на этаноле, обеспечивающие максимальные показатели синтеза ПАВ.

Недавно [2] появилось одно из первых сообщений о способности представителей рода *Acinetobacter* синтезировать низкомолекулярные ПАВ, однако на основе гидрофобных субстратов. До недавнего времени в литературе была информация о синтезе бактериями рода *Acinetobacter* лишь высокомолекулярных эмульгаторов (комплексы внеклеточных липо-, полисахаридов и белков), но не низкомолекулярных поверхностно-активных веществ [3–7].

Одним из подходов к интенсификации технологий микробного синтеза является внесение экзогенных предшественников в среду культивирования продуцента.

Отметим, что на сегодняшний день термин “предшественники биосинтеза” не имеет четкого определения. Это понятие по-разному трактуют

микробиологи, биохимики, молекулярные биологи и биотехнологи. Так, согласно терминологии микробиологов и биохимиков предшественники биосинтеза — это интермедиаты центральных метаболических путей (цикл трикарбоновых кислот, гликолиз/глюконеогенез, пентозофосфатный цикл), являющиеся исходными для процессов конструктивного метаболизма [8, 9]. В биотехнологии предшественниками принято называть соединения, близкие по структуре к определенным фрагментам молекулы целевого продукта [10]. Так, например, для повышения синтеза поверхностно-активных манозилэритритоллипидов в качестве предшественников использовали маннозу (глюкозу) и эритритол, входящие в состав гликолипидов [11–13].

В биотехнологии вторичных метаболитов (например, антибиотики) как предшественники биосинтеза рассматриваются низкомолекулярные соединения (чаще всего аминокислоты), образующиеся в первичном метаболизме и стимулирующие синтез вторичных метаболитов [14–16].

В работах [17, 18] в качестве липидных предшественников поверхностно-активных софоролипидов авторы использовали неуглеводные субстраты (гексадекан, соевое и подсолнечное масло), вносимые в среду с глюкозой для повышения синтеза ПАВ. В некоторых статьях [18] эти же неуглеводные субстраты названы “вторичными источниками углерода”. Различные растительные масла, используемые в качестве ростовых субстратов для образования поверхностно-активных рамнолипидов, также определяют как предшественники биосинтеза [19]. Экзогенные ненасыщенные жирные кислоты рассматриваются в ка-

честве предшественников биосинтеза этиловых эфиров у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [20], а мевалонат – предшественника каротиногенеза у рекомбинантного штамма *Escherichia coli* [21].

Эти примеры свидетельствуют о необходимости уточнения термина “предшественники биосинтеза”. Мы придерживаемся мнения большинства исследователей, что предшественники биосинтеза – это промежуточные продукты метаболизма ростового субстрата (первичные метаболиты), являющиеся исходными соединениями для процессов конструктивного метаболизма либо используемые в качестве регуляторов (индукторы) синтеза целевого продукта.

Так, ранее нами было показано, что внесение 0.2% фумарата (предшественник глюконеогенеза) и 0.1% цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на этаноле сопровождалось увеличением показателей синтеза ПАВ на 40–100% по сравнению с выращиванием бактерий на среде без фумарата и цитрата [22]. Повышение синтеза ПАВ в таких условиях культивирования штамма ЭК-1 обусловлено усилением глюконеогенеза, что подтверждалось увеличением в 1.5 и 3.5 раза активности изоцитратлиазы и фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (ключевые ферменты гликоциклического цикла и глюконеогенетической ветви обмена веществ соответственно), а также синтеза липидов, о чем могло свидетельствовать снижение в 1.5 раза активности изоцитратдегидрогеназы [22].

Увеличение в 1.5–1.7 раза концентрации ПАВ при внесении в среду культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 с н-гексадеканом 0.2% фумарата и 0.1% цитрата обусловлено интенсификацией синтеза трегалозомиколатов, что подтверждалось повышением в 3–5 раз фосфоенолпируватсинтетазы и трегалозофосфатсинтетазы соответственно [23].

Цель работы – исследование возможности интенсификации синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии фумарата и цитрата.

## МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Исследовали штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером ИМВ В-7241.

**Состав сред и условия культивирования *A. calcoaceticus* К-4.** Бактерии выращивали на модифицированной нами среде Мюнца [1] (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  – 0.3,  $\text{NaCl}$  – 1.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.14,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1, pH 6.8–7.0. В среду культивирования дополнительно

вносили дрожжевой автолизат – 0.5% (по объему) и раствор микроэлементов [1].

В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 2% (по объему).

В качестве предшественников синтеза ПАВ использовали цитрат натрия и фумарат натрия в концентрации 0.01–0.5%. Соли органических кислот вносили в среду в виде 10%-ных растворов в начале процесса культивирования, а также в конце экспоненциальной фазы роста.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродного питания и при добавлении их в среду меняется не только концентрация углерода, но и соотношение С/Н, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания основного источника углеродного питания (этанол). Цель коррекции – ввести эквивалентное количество углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в среде культивирования продуцента.

В одном из вариантов культивирования 1–2 раза в 1 сут осуществляли нейтрализацию культуральной жидкости 10%-ным раствором  $\text{NaOH}$ .

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30°C в течение 24–120 ч.

В качестве посевного материала использовали культуру в экспоненциальной фазе роста (48 ч) в концентрации 5% от объема среды.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую массу клеток по калибровочному графику.

**Определение показателей синтеза ПАВ.** Способность к синтезу ПАВ оценивали по показателям: поверхностное натяжение ( $\sigma_s$ ) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ\*, безразмерная величина), индекс эмульгирования ( $E_{24}$ , %) культуральной жидкости, которые определяли, как описано в наших предыдущих работах [1, 22, 23]. Количество синтезированных внеклеточных ПАВ (г/л) определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной нами смесью Фолча [1]. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 г в течение 20 мин. Выделение внеклеточных ПАВ осуществляли, как описано ниже.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 500 мл помещали 100 мл супернатанта, добавляли 20 мл 1 М раствора  $\text{HCl}$ , воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли еще 15 мл 1 М раствора  $\text{HCl}$  и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь

оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 35 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 100 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на ротаторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы.

**Получение бесклеточных экстрактов.** Бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* K-4 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4°C). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0.05 М K<sup>+</sup>-фосфатным буфером (pH 7.0), центрифугируя (5000 g, 20 мин, 4°C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0.05 М K<sup>+</sup>-фосфатном буфере (pH 7.0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 4 раза по 40 с при 4°C на аппарате УЗДН-1 (Россия). Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4°C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Для получения бесклеточных экстрактов использовали клетки, находящиеся в начале экспоненциальной и стационарной фазы роста (24 и 72 ч культивирования соответственно).

**Анализ ферментов.** Анализировали активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37, КФ 1.1.1.82), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2), ФЕП-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31), как описано в работе [24], активность трегалозофосфатсинтазы (КФ 2.4.1.15) – в работе [23].

При исследовании влияния катионов натрия на активность ФЕП-синтетазы, ФЕП-карбоксикиназы, НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы и ФЕП-карбоксилазы отмывание клеток, ультразвуковую обработку и определение активности ферментов осуществляли в 0.05 М трис-фосфатном буфере (pH 7.0). Концентрация катионов в реакционной смеси составляла 25 и 50 мМ. Катионы вносили в реакционную смесь в виде 20%-ного раствора NaCl.

Содержание белка в бесклеточных экстрактах рассчитывали по Бредфорд [25]; активность ферментов определяли при 28–30°C – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* K-4.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано в работе [26]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях предположение о положительном влиянии на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 цитрата (регулятор синтеза липидов) и C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот – предшественников глюконеогенетической ветви обмена веществ, функционирующей при росте микроорганизмов на неуглеводных субстратах, было сделано, исходя из химической природы поверхностно-активных веществ (комплекс глико-, фосфо- и нейтральных липидов) [22, 23]. Так как ПАВ, синтезируемые *A. calcoaceticus* K-4 в оптимальных условиях культивирования на этаноле, представляют собой комплекс глико-, amino- и нейтральных липидов [1], мы предположили, что и в этом случае добавление в среду фумарата и цитрата может сопровождаться повышением эффективности процесса биосинтеза ПАВ.

**Определение оптимальных концентраций и момента внесения органических кислот в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4.** На первом этапе, аналогично исследованиям, проведенным с *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23], изучали влияние предшественников (0.1–0.5%) на синтез ПАВ при внесении их в среду с этанолом в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста *A. calcoaceticus* K-4 (табл. 1). Как видно из представленных в табл. 1 данных, эффект от внесения 0.1–0.3% цитрата практически отсутствовал (условная концентрация ПАВ\* не отличалась от таковой в контрольном варианте и составляла 4.0–4.2), а для таких же концентраций фумарата оказался незначительным (повышение показателя ПАВ\* на 20% при концентрации фумарата 0.1%). Кроме того, по мере увеличения концентрации органических кислот до 0.5% наблюдали снижение показателя условной концентрации ПАВ\*.

В связи с этим на следующем этапе исследований концентрацию фумарата и цитрата снижали до 0.01–0.04% и осуществляли внесение органических кислот в среду с этанолом как в начале процесса культивирования *A. calcoaceticus* K-4, так и в конце экспоненциальной фазы роста (табл. 2). Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что добавление фумарата или цитрата в концентрации 0.02% в конце экспоненциальной фазы роста сопровождалось повышением показателя ПАВ\* на 48–51%. Отметим, что в таких условиях культивирования индекс эмульгирования культуральной жидкости увеличивал-

**Таблица 1.** Влияние органических кислот на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле

Органическая кислота	Концентрация кислоты, %	ПАВ*
Цитрат	0.1	4.2 ± 0.21
	0.2	4.2 ± 0.21
	0.3	4.2 ± 0.21
	0.4	3.0 ± 0.15
	0.5	2.5 ± 0.12
Фумарат	0.1	4.8 ± 0.24
	0.2	4.5 ± 0.22
	0.3	4.1 ± 0.21
	0.4	3.8 ± 0.19
	0.5	3.6 ± 0.18
Контроль (без органических кислот)	0	3.9 ± 0.19

Примечание. Внесение цитрата и фумарата осуществляли в конце экспоненциальной фазы роста (48 ч).

ся незначительно (на 15–18%). Эти данные могут свидетельствовать об усилении в присутствии фумарата или цитрата синтеза штаммом К-4 метаболитов именно с поверхностно-активными свойствами.

Таким образом, оптимальная концентрация фумарата и цитрата, обеспечивающая повышение синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом, оказалась на порядок ниже, чем для *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23]. Для обоих штаммов существенное увеличение показателей синтеза ПАВ наблюдали только в случае внесения органических кислот в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста.

**Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата.** В последующих экспериментах в среду культивирования *A. calcoaceticus* К-4 с этанолом одновременно добавляли фумарат и цитрат в оптимальных концентрациях (по 0.02%). Внесение органических кислот осуществляли как в начале процесса культивирования, так и в конце экспоненциальной фазы роста (табл. 2). Однако эффект от совместного внесения фумарата и цитрата оказался незначительным: условная концентрация ПАВ\* составляла 4.6 и 5.7 при внесении органических кислот в начале процесса и в конце экспоненциальной фазы роста соответственно и практически не отличалась от таковой в присутствии только цитрата или только фумарата (табл. 2). Отметим, что внесение органических кислот не сопровождалось повышением уровня биомассы по сравнению с культивированием штамма К-4

на среде без фумарата и цитрата. В обоих случаях концентрация биомассы составляла 1.4–1.5 г/л.

**C<sub>2</sub>-метаболизм при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии органических кислот.** Для выяснения причин незначительного повышения синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата анализировали активность ферментов, с помощью которых эти органические кислоты вовлекаются в метаболизм (табл. 3), и активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ (табл. 4).

Как видно из представленных в табл. 3 данных, при внесении фумарата и цитрата в конце экспоненциальной фазы роста наблюдали увеличение в 1.5–2.5 раза активности всех исследуемых ферментов, за исключением изоцитратлиазы, активность которой повышалась всего в 1.2 раза. Эти данные свидетельствуют об ассимиляции органических кислот штаммом К-4.

Дальнейшие исследования активности ферментов показали, что при культивировании на этаноле у *A. calcoaceticus* К-4 функционирует неполный цикл трикарбоновых кислот (отсутствует активность 2-оксоглутарат-дегидрогеназы), а в качестве анаэробного пути – глиоксилатный цикл и ФЕП-карбоксилазная реакция (табл. 3 и 4). Отметим, что реакция карбоксилирования фосфоенолпирувата (как и карбоксилирование пирувата) является анаэробной при выращивании микроорганизмов на углеводных субстратах [8, 9]. Мы предположили, что физиологическая роль ФЕП-карбоксилазы при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде, содержащей мочевины в качестве источника азотного питания, состоит в обезвреживании высоких концентраций углекислого газа, образующегося при гидролизе мочевины в уреазной реакции [27], т.е. ФЕП-карбоксилазная реакция является своеобразным стоком избыточного CO<sub>2</sub> в клетках этих бактерий. Кроме того, в результате функционирования ФЕП-карбоксилазы не только снижается концентрация углекислого газа, но и повышается содержание C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот, являющихся предшественниками глюконеогенеза. Таким образом, физиологическое значение ФЕП-карбоксилазы при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом и мочевиной может состоять также в усилении глюконеогенеза и, следовательно, повышении синтеза поверхностно-активных гликолипидов. Об этом свидетельствуют и результаты наших предыдущих исследований по определению оптимальных условий культивирования штамма К-4: наиболее высокие показатели синтеза ПАВ отмечались при использовании в качестве источника азота именно мочевины [1].

Данные, приведенные в табл. 4, свидетельствуют о том, что в присутствии фумарата и цитрата происходит усиление синтеза гликолипидов,

**Таблица 2.** Синтез ПАВ в зависимости от концентрации органических кислот и времени их внесения в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4

Внесение органической кислоты	Фумарат, %	Цитрат, %	ПАВ*	E <sub>24</sub> , %
Начало процесса культивирования	0.01	0	4.5 ± 0.22	65 ± 3
	0.02	0	4.8 ± 0.24	68 ± 3
	0.03	0	4.7 ± 0.23	70 ± 3
	0.04	0	4.2 ± 0.21	69 ± 3
	0	0.01	4.2 ± 0.21	73 ± 3
	0	0.02	4.5 ± 0.22	75 ± 4
	0	0.03	4.1 ± 0.21	73 ± 3
	0	0.04	4.0 ± 0.20	69 ± 3
	0.02	0.02	4.6 ± 0.23	72 ± 3
	В конце экспоненциальной фазы роста	0.01	0	5.3 ± 0.26
0.02		0	5.9 ± 0.29	79 ± 4
0.03		0	5.0 ± 0.25	71 ± 3
0.04		0	4.9 ± 0.24	68 ± 3
0		0.01	5.2 ± 0.26	78 ± 4
0		0.02	5.8 ± 0.29	77 ± 4
0		0.03	5.1 ± 0.25	80 ± 4
0		0.04	4.8 ± 0.24	77 ± 4
0.02		0.02	5.7 ± 0.29	69 ± 3
Контроль (без фумарата)		0	0	3.9 ± 0.19

Примечание. Индекс эмульгирования определяли для неразбавленной культуральной жидкости.

причем независимо от момента внесения органических кислот в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4. Подтверждением этому является увеличение в таких условиях культивирования

активности ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-синтетазы. Отметим, что в присутствии фумарата и цитрата наблюдали (в отличие от ФЕП-синтетазы) снижение активности другого ключевого фермента глюконеогенеза – ФЕП-карбоксикиназы (табл. 4). Увеличение активности изоцитратдегидрогеназы и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы, а также отсутствие 2-оксоглутаратдегидрогеназы при культивировании штамма K-4 на этаноле в присутствии фумарата и цитрата может свидетельствовать об усилении синтеза амфилипидов (табл. 3 и 4).

Таким образом, анализы активности ферментов (в отличие от показателя условной концентрации ПАВ\*) свидетельствовали о повышении биосинтеза ПАВ при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата.

**Интенсификация синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* K-4 в присутствии органических кислот.** Мы предположили, что наблюдаемое явление может быть обусловлено использованием в качестве критерия синтеза ПАВ показателя условной концентрации поверхностно-активных веществ, поскольку график зависимости поверхностного натяжения от логарифма разведения свободной от клеток культуральной жидкости штамма K-4 отличался от таковых для других продуцентов ПАВ наличием не одной, а нескольких точек повышения поверхностного натяжения с последующим снижением при увеличении разведения. В связи с этим в качестве показателя синтеза использовали концентрацию внеклеточных ПАВ (г/л), определяемую весовым методом после экстракции органическими растворителями (табл. 5). Действительно, такой показатель оказался корректнее, и данные ростовых экспериментов (табл. 5) коррелировали с результатами анализа активности ферментов (табл. 4). Оказалось неожиданным,

**Таблица 3.** Активность ферментов, обеспечивающих вовлечение фумарата и цитрата в метаболизм при культивировании *A. calcoaceticus* K-4 на этаноле в присутствии органических кислот

Внесение органической кислоты	Органическая кислота	Активность, нмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> белка				
		НАДФ <sup>+</sup> -зависимая изоцитратдегидрогеназа	изоцитратлиаза	фумаратгидратаза	НАД <sup>+</sup> -зависимая малатдегидрогеназа	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая малатдегидрогеназа
В начале процесса культивирования	Цитрат	581 ± 29	243 ± 12	210 ± 10	124 ± 6	219 ± 11
	Фумарат	881 ± 44	273 ± 13	225 ± 11	204 ± 10	88 ± 4
	Цитрат + фумарат	602 ± 30	309 ± 15	204 ± 10	201 ± 10	120 ± 6
В конце экспоненциальной фазы роста	Цитрат	676 ± 33	280 ± 14	575 ± 28	90 ± 4	45 ± 2
	Фумарат	602 ± 30	309 ± 15	781 ± 39	161 ± 8	361 ± 18
	Цитрат + фумарат	944 ± 47	298 ± 14	769 ± 38	215 ± 10	258 ± 12
Контроль (без органических кислот)		601 ± 30	266 ± 13	326 ± 16	129 ± 6	129 ± 6

Примечание. Концентрация фумарата и цитрата составляла 0.02%, активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч).

**Таблица 4.** Активность ферментов биосинтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии органических кислот

Внесение органической кислоты	Органическая кислота	Активность, нмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> белка			
		ФЕП-синтеза	ФЕП-карбоксиказы	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
В начале процесса культивирования	Цитрат	166 ± 8	166 ± 8	375 ± 18	563 ± 28
	Фумарат	440 ± 22	264 ± 13	307 ± 15	491 ± 24
	Цитрат + фумарат	402 ± 20	120 ± 5	301 ± 15	925 ± 46
В конце экспоненциальной фазы роста	Цитрат	225 ± 11	225 ± 11	Н.о.	Н.о.
	Фумарат	281 ± 14	160 ± 8	Н.о.	Н.о.
	Цитрат + фумарат	472 ± 23	172 ± 8	390 ± 20	1205 ± 60
Контроль (без органических кислот)		172 ± 8	215 ± 10	242 ± 12	727 ± 36

Примечание. Концентрация фумарата и цитрата составляла 0.02%; активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч); Н.о. – не определяли.

что наиболее высокие показатели синтеза ПАВ наблюдались при одновременном внесении фумарата и цитрата в концентрации 0.01%, а не 0.02%, как было установлено ранее (табл. 2). Так, добавление 0.01% органических кислот в среду с этанолом в конце экспоненциальной фазы роста *A. calcoaceticus* К-4 сопровождалось увеличением концентрации синтезированных ПАВ почти в 3 раза (с 1.7 до 5.0 г/л) по сравнению с культивированием бактерий на среде без фумарата и цитрата (табл. 5). При внесении органических кислот в концентрации 0.02% наблюдали повышение синтеза ПАВ до 3.2 г/л (почти в 2 раза выше, чем на среде без органических кислот). Отметим, что в отличие от *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23], при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 как на этаноле, так и этаноле в присутствии фумарата и цитрата,

**Таблица 5.** Синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии различных концентраций фумарата и цитрата

Органическая кислота, %	ПАВ, г/л	E <sub>24</sub> , % (1 : 49)
Цитрат, 0.01	2.6 ± 0.13	91 ± 4
Цитрат, 0.02	2.6 ± 0.13	100 ± 5
Цитрат, 0.1	1.9 ± 0.10	87 ± 4
Фумарат, 0.01	2.8 ± 0.14	100 ± 5
Фумарат, 0.02	2.5 ± 0.12	87 ± 4
Фумарат, 0.1	2.1 ± 0.10	88 ± 4
Цитрат, 0.01 + фумарат, 0.01	5.0 ± 0.25	89 ± 4
Цитрат, 0.02 + фумарат, 0.02	3.2 ± 0.16	79 ± 4
Цитрат, 0.1 + фумарат, 0.1	2.8 ± 0.14	88 ± 4
Контроль (без органических кислот)	1.7 ± 0.09	88 ± 4

Примечание. Внесение цитрата и фумарата осуществляли в конце экспоненциальной фазы роста (48 ч культивирования).

индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся.

Ранее [28] нами было показано, что наиболее подходящими критериями, позволяющими корректно оценить содержание синтезируемых *R. erythropolis* ЭК-1 метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами, являются показатель условной концентрации поверхностно-активных веществ (ПАВ\*) и индекс эмульгирования культуральной жидкости, определяемый для ряда последовательных разведений. Полученные ранее сведения [28] и результаты данной статьи свидетельствуют о необходимости и важности правильного выбора корректных критериев оценки синтеза не только поверхностно-активных веществ, но и других продуктов микробного синтеза. Что же касается поверхностно-активных веществ, то в зависимости от конкретного продуцента и химической природы синтезируемых метаболитов объективные показатели синтеза ПАВ могут оказаться различными.

Отметим также, что показатель условной концентрации ПАВ\* является экспресс-методом оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости и позволяет достаточно быстро осуществить анализ и иметь представление о ходе процесса биосинтеза. Определение количества ПАВ (г/л) весовым методом является более трудоемким и длительным методом анализа.

Вместе с тем из литературы известно, что некоторые бактерии рода *Acinetobacter* синтезируют не обладающие поверхностной активностью липиды, которые экстрагируются смесью Фолча [29–32]. Так, в условиях лимитирования азотом воска и ацилглицериды образует *Acinetobacter* sp. M-1 [31], *Acinetobacter* sp. ADP1 [32], *Acinetobacter* sp. HO1-N [29], *A. calcoaceticus* BD413 [30]. Однако способность к синтезу таких липидов обнаружена при культивировании штаммов на гидрофобных

**Таблица 6.** Влияние фумарата (0.01%) и цитрата (0.01%) на активность ферментов C<sub>2</sub>-метаболизма при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле

Внесение фумарата и цитрата	Активность, нмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> белка								ПАВ*
	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая изоцитратдегидрогеназа	изоцитратлиаза	фумаратгидратаза	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикиназа	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза	трегалозофосфатсинтаза	
В начале процесса	600 ± 30	250 ± 12	339 ± 17	543 ± 27	220 ± 11	250 ± 12	1015 ± 51	33 ± 2	4.4 ± 0.22
В конце экспоненциальной фазы	720 ± 36	260 ± 13	600 ± 30	1267 ± 63	232 ± 12	400 ± 20	1768 ± 88	48 ± 3	5.9 ± 0.29
В конце экспоненциальной фазы (нейтрализация)	800 ± 40	270 ± 14	580 ± 29	900 ± 45	162 ± 8	290 ± 14	1300 ± 65	33 ± 2	4.0 ± 0.20
Контроль (без органических кислот)	587 ± 29	255 ± 12	314 ± 15	180 ± 9	206 ± 10	239 ± 12	697 ± 35	15 ± 1	3.8 ± 0.19

Примечание. Активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч).

субстратах, а сами липиды локализованы преимущественно внутри клеток. Внеклеточные воски и ацилглицериды в концентрации 0.3–0.4 г/л синтезируют на среде с гексадеканолом *Acinetobacter* sp. НО1-N [29]. Не исключено, что исследуемый нами штамм *A. calcoaceticus* К-4, кроме поверхностно-активных, образует также и не обладающие поверхностной активностью внеклеточные липиды, синтез которых может усиливаться в присутствии фумарата и цитрата. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования. Отметим, однако, что поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости *A. calcoaceticus* К-4 составляло 43–45 мН/м, а после экстракции из супернатанта препарата ПАВ и растворения его в воде (до исходного объема супернатанта) этот показатель снижался до 29–31 мН/м. После выделения препарата ПАВ из супернатанта последний терял поверхностно-активные свойства. Эти результаты позволяют утверждать, что синтезируемые штаммом К-4 внеклеточные метаболиты являются эффективными ПАВ.

**Механизмы повышения синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 в присутствии фумарата и цитрата.** Анализировали активность ферментов биосинтеза ПАВ при внесении в среду с этанолом органических кислот в концентрации 0.01% (табл. 6). Установленные закономерности в целом оказались аналогичными использованию фумарата и цитрата в концентрации 0.02% (табл. 3 и 4), однако более существенным было повышение активности ФЕП-синтетазы и ФЕП-карбоксилазы (бо-

лее чем в 7 и 2.4 раза по отношению к контролю соответственно, в то время как при внесении 0.02% органических кислот активность этих ферментов увеличивалась в 2.7 и 1.7 раза) (табл. 6). Эти результаты могут свидетельствовать об усилении синтеза в таких условиях культивирования штамма К-4 именно поверхностно-активных гликолипидов. Подтверждением этому было повышение более чем в 3 раза активности трегалозофосфатсинтазы – ключевого фермента биосинтеза трегалозомиколоатов. Отметим, что при более высоких концентрациях органических кислот активность этого фермента несущественно отличалась от контрольного варианта.

**Влияние pH на синтез ПАВ при культивировании штамма К-4 на среде с этанолом и органическими кислотами.** При культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом уже на 2 сут наблюдали снижение pH культуральной жидкости до 5.5–5.7, а к концу процесса – до 4.5–5.0. Поскольку у большинства бактерий соли органических кислот транспортируются в клетки вместе с протоном [33] и оптимальным для этого является нейтральное значение pH, мы предположили, что нейтрализация культуральной жидкости в процессе роста штамма К-4 (а также перед внесением органических кислот) будет сопровождаться повышением синтеза ПАВ. Однако эксперименты показали, что при нейтрализации наблюдалось некоторое снижение показателей образования ПАВ, которое коррелировало со снижением активности ферментов их биосинтеза (табл. 6).

**Таблица 7.** Влияние катионов натрия на активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* К-4

Na <sup>+</sup> в реакционной смеси, мМ	Активность, нмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> белка			
	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикиназа	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
0	1833 ± 92	741 ± 37	833 ± 42	617 ± 31
25	1333 ± 67	Н.о.	167 ± 8	Н.о.
50	1000 ± 50	741 ± 37	167 ± 8	370 ± 19

Примечание. Активность ферментов определяли для клеток, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч); Н.о. — не определяли.

Вполне вероятно, что наблюдаемое явление может быть обусловлено ингибирующим влиянием на активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ катионов натрия, поскольку для нейтрализации культуральной жидкости в процессе выращивания *A. calcoaceticus* К-4 использовали раствор NaOH. Для проверки этого предположения анализировали активность ферментов в присутствии катионов натрия (табл. 7). Как видно из представленных в табл. 7 данных, Na<sup>+</sup> в концентрации 25–50 мМ является ингибитором ферментов биосинтеза поверхностно-активных гликолипидов (ФЕП-синтетаза и ФЕП-карбоксилаза), а также аминокислот (НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы). Полученные результаты следует учитывать при разработке биотехнологии поверхностно-активных веществ, в частности.

Установленные нами закономерности по влиянию предшественников на образование ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 отличаются от таковых для *R. erythropolis* ЭК-1 [22]: во-первых, оптимальная концентрация фумарата и цитрата для штамма К-4 в 10 раз ниже; во-вторых, в присутствии органических кислот происходит усиление синтеза *A. calcoaceticus* К-4 только поверхностно-активных веществ; в-третьих, эффект от совместного внесения органических кислот в среду культивирования штамма К-4 с этанолом более существенен — концентрация ПАВ увеличивается почти в 3 раза, в то время как для *R. erythropolis* ЭК-1 — всего в 2 раза.

Результаты наших исследований отличаются также и от известных данных литературы: в литературе описано увеличение синтеза ПАВ при наличии в среде только цитрата, который вносили в начале процесса культивирования [34], оптимальная концентрация цитрата при этом составляла 0.5–1.0%. При такой концентрации цитрат можно рассматривать не как регулятор синтеза липидов, а как дополнительный ростовой субстрат.

Отметим также, что нам не удалось обнаружить в литературе сведений о повышении синтеза ПАВ в присутствии как цитрата, так и C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот.

Таким образом, в процессе проведенной работы показана возможность интенсификации образования ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 при внесении в среду с этанолом предшественников биосинтеза метаболитов липидной и углеводной природы. Установлены оптимальные концентрации цитрата и фумарата (0.01–0.02%), внесение которых в конце экспоненциальной фазы роста обеспечивает повышение на 45–55% показателя условной концентрации ПАВ\*.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регуляции процессов биосинтеза у *A. calcoaceticus* К-4 и изменения их направленности в сторону образования ПАВ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 304–310.
2. Zhao Z., Wong J.W.C. // Environ. Technol. 2009. V. 30. № 3. P. 291–299.
3. Rosenberg E., Rubinovitz C., Legmann R., Ron E.Z. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 2. P. 323–326.
4. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. № 2. P. 154–162.
5. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 3. P. 1102–1106.
6. Walzer G., Rozenberg E., Ron E.Z. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 6. P. 1026–1032.
7. Dams-Kozłowska H., Mercaldi M.P., Panilaitis B.J., Kaplan D.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 81. № 2. P. 201–210.
8. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.
9. Современная микробиология. Прокариоты / Ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с.
10. Квесутадзе Г.И., Безбородов А.Н. Введение в биотехнологию. М.: Наука, 2002. 284 с.
11. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. № 1. P. 37–46.
12. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. // J. Biosci. Bioeng. 2007. V. 104. № 1. P. 78–81.

13. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. // J. Biosci. Bioeng. 2008. V. 105. № 5. P. 493–502.
14. Demain A.L. // Int. Microbiol. 1998. V. 1. № 4. P. 259–264.
15. Khetan A., Malmberg L.H., Kyung Y.S., Sherman D.H., Hu W.S. // Biotechnol. Prog. 1999. V. 15. № 6. P. 1020–1027.
16. Powell A., Al Nakeeb M., Wilkinson B., Micklefield J. // Chem. Commun. 2007. V. 14. № 26. P. 2683–2685.
17. Davila A.M., Vandecasteele R., Marsha J.P. // J. Ind. Microbiol. 1994. V. 13. № 1. P. 249–257.
18. Hu Y., Ju L.K. // Enz. Microb. Technol. 2001. V. 21. № 1. P. 593–601.
19. Raza Z.A., Khan M.S., Khalid Z.M., Rehman A. // Biotechnol. Lett. 2006. V. 28. № 20. P. 1623–1631.
20. Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijk P., Thevelein J.M., Delvaux F.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 2. P. 454–461.
21. Yoon S.H., Park H.M., Kim J.E., Lee S.H., Choi M.S., Kim J.Y., Oh D.K., Keasling J.D., Kim S.W. // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. № 3. P. 599–605.
22. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. // Микробиология. 2009. Т. 77. № 6. С. 749–757.
23. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
24. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 459–465.
25. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
26. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
27. Mobely H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P. // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. № 3. P. 451–479.
28. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
29. Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. // J. Bacteriol. 1985. V. 162. № 1. P. 162–169.
30. Reiser S., Somerville C. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 9. P. 2969–2975.
31. Ishige T., Tani A., Sakai Y., Kato N. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 8. P. 3481–3486.
32. Stoveken T., Kalscheuer R., Malkus U., Reichelt R., Steinbuechel A. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 4. P. 1369–1376.
33. Ивановский Р.Н. Биоэнергетика и транспорт субстратов у бактерий. М.: МАКСПресс, 2001. 46 с.
34. de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. // Can. J. Microbiol. 1989. V. 35. № 9. P. 854–859.

## Production of Surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 Grown on Ethanol with Organic Acids

T. P. Pirog<sup>a</sup>, T. A. Shevchuk<sup>a</sup>, A. D. Konon<sup>b</sup>, and E. Yu. Dolotenko<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 03680 Ukraine

<sup>b</sup> National University of Food Technologies, Kiev, 01601 Ukraine

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Received September 19, 2011

**Abstract**—The effect of fumarate (C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid, a gluconeogenesis precursor) and citrate (a lipid synthesis regulator) on the production of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 grown on ethanol has been studied. Simultaneous addition of fumarate and citrate to concentrations of 0.01–0.02% at the end of the log phase of K-4 growth in a medium with 2 vol % ethanol increases the nominal surfactant concentration by 45–55% in comparison with a culture without organic acids. The increased level of surfactant production in the presence of fumarate and citrate is determined by the increase in the activities of enzymes involved in the production of glycolipids (phosphoenolpyruvate synthase and trehalose phosphate synthase) and aminolipids (NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase) by factors of 1.7–7, as well as by the simultaneous operation of two anaplerotic pathways: the glyoxylate cycle and the reaction catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase.