

**Т.П. Пирог^{1,2}, І.В. Савенко¹, Т.А. Шевчук²,
Н.В. Крутоус¹, Г.О. Іутинська²**

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна
²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Мета. Дослідження антимікробних властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 залежно від наявності дріжджового автолізату і мікроелементів у складі етанол-, *n*-гексадекан- і гліцеринвмісних середовищ. **Методи.** Антимікробні щодо бактерій (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2) та дріжджів (*Candida albicans* Д-6) властивості ПАР визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). **Результати.** Виключення зі складу середовища культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 дріжджового автолізату і суміші мікроелементів та заміна їх на сульфат міді і сульфат заліза у середовищі з етанолом та *n*-гексадеканом, а у середовищі з гліцерином – на хлорид калію, сульфат цинку і сульфат міді супроводжувалися зниженням антимікробних властивостей ПАР. Найефективнішими антимікробними агентами виявилися ПАР, синтезовані на етанолі за наявності дріжджового автолізату і мікроелементів (МІК 9–20 мкг/мл), у той час як ПАР, отримані в аналогічних умовах культивування на гліцерині і *n*-гексадекані інгібували ріст досліджуваних бактерій та дріжджів у вищих (9–68 і 27–54 мкг/мл відповідно) концентраціях. Показник мінімальної інгібуючої концентрації ПАР, синтезованих у середовищі з етанолом (гліцерином, *n*-гексадеканом), дріжджовим автолізатом і мікроелементами, корелював з активністю НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів (610±30, 395±24, 397±24 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка відповідно). **Висновки.** Вища активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту штаму IMB B-7241 у середовищі з етанолом (*n*-гексадеканом), дріжджовим автолізатом та мікроелементами порівняно з такою у середовищі з сульфатом заліза і сульфатом міді, а також збільшення активності ферменту за наявності Zn²⁺ засвідчує можливість посилення синтезу аміноліпідів у разі внесення у середовище з етанолом (*n*-гексадеканом) катіонів цинку. Одержані дані показують також необхідність досліджень впливу умов культивування продуцента на біологічні властивості синтезованих ПАР.

К л ю ч о в і с л о в а: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхнево-активні речовини, умови культивування, антимікробні властивості.

У попередніх дослідженнях [4] було встановлено залежність антиадгезивних властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР) від наявності у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 факто-

рів росту і певних мікроелементів, а також природи джерела вуглецевого живлення (етанол, гліцерин, *n*-гексадекан). Заміна дріжджового автолізу та суміші мікроелементів у складі етанол- і *n*-гексадеканвмісних середовищ на сульфат міді і сульфат заліза, а у середовищі з гліцирином – на хлорид калію, сульфат цинку і сульфат міді супроводжувалася підвищенням синтезу ПАР [6], проте зниженням їх антиадгезивних властивостей [4].

Такі дані свідчать, що не завжди підвищення синтезу ПАР супроводжується утворенням цільового продукту з необхідними біологічними властивостями, а також про необхідність досліджень залежності властивостей поверхнево-активних речовин від умов культивування продуцента. У праці [4] ми зазначали, що дотепер, на жаль, ця проблема залишається поза увагою дослідників. Хоча перші роботи, в яких наведено дані взаємозв'язку хімічного складу мікробних ПАР та їх властивостей, були опубліковані близько 15 років тому [13, 19].

Так, у праці [19] було встановлено, що штам *Tsukamurella* spec. DSM 44370 на середовищі з соняшниковою олією синтезує комплекс гліколіпідної природи: трегалозоліпід (GL1), трисахаридний ліпід (GL2), тетрасахаридний ліпід (GL3), співвідношення яких залежало від наявності гідрофільного попередника (глюкоза, галактоза, сахароза, трегалоза) і концентрації джерела фосфору у середовищі культивування продуцента. Гліколіпіди GL1, GL2 і GL3 різнилися за антибактеріальною та антифунгальною активністю.

Штам *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 на середовищі з відходами переробки соєвих бобів синтезує комплекс рамноліпідів, що містить 7 гомологічних сполук [13], лише дві з яких проявляли антимікробний ефект щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій і мікроміцетів, проте не діяли на дріжджі.

Нещодавно [11] було встановлено, що прояв антимікробної та антифунгальної дії поверхнево-активних ліпопептидів залежить як від довжини пептидної частини, так і послідовності амінокислот у їх складі. Так, мастеоліт та віскозин, синтезовані штамом *Pseudomonas* sp. різняться лише за однією амінокислотою, проте перший удвічі активніший щодо *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium avium-intercellulare*.

У роботі [16] зазначається, що на сьогодні неможливо зміною умов культивування досягти біосинтезу ліпопептидів певного складу з наперед заданими біологічними властивостями. Це можна зробити тільки в результаті постферментаційної хімічної модифікації синтезованих ліпопептидів.

У 2014 році [17] з'явилася інформація про залежність антифунгальних властивостей ліпопептидів від джерела вуглецю у середовищі культивування штаму *Bacillus* sp AR2. Так, ліпопептидний комплекс, синтезований на середовищі з сахарозою, декстрозою та гліцирином, за вмістом жирних кислот і амінокислотою послідовністю був віднесений до гомологів ітурину, фенгіцину та сурфактину і проявляв максимальні антифунгальні властивості.

Раніше [3] ми встановили, що поверхнево-активним речовинам, синтезованим *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі, притаманні антимікробні властивості, у тому числі й щодо фітопатогенних бактерій [14].

Мета даної роботи – дослідити вплив факторів росту і мікроелементів

у складі етанол-, *n*-гексадекан- і гліцеринвмісних середовищ на антими-
кробні властивості ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інститу-
ту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії
наук України за номером ІМВ В-7241.

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вирощували у рідкому
мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, 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, вода дис-
тильована – до 1 л, рН 6,8–7,0. У середовище також додатково вносили
дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів –
0,1 % (об'ємна частка), що містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1;
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –
0,03; H_3BO_3 – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5.

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол, *n*-гексадекан у
концентрації 2 % (об'ємна частка), гліцерин – 1 % (об'ємна частка).

В одному з варіантів у середовище з етанолом і *n*-гексадеканом за-
мість дріжджового автолізату і розчину мікроелементів вносили Cu^{2+}
(0,16 мкмоль/л) і Fe^{2+} (3,6 мкмоль/л), а в середовище з гліцерином – Zn^{2+}
(38 мкмоль/л), Cu^{2+} (0,16 мкмоль/л) і K^+ у концентрації 0,21 ммоль/л, як
описано у праці [4].

Посівний матеріал – культура в середині експоненційної фази росту,
вирощена у середовищі наведеного вище складу з $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ без дріж-
джового автолізату і мікроелементів. Як джерело вуглецю і енергії для
одержання інокуляту використовували етанол, *n*-гексадекан, гліцерин у
концентрації 0,5 % (об'ємна частка). Кількість інокуляту – 5 % від об'єму
середовища (10^4 – 10^5 клітин/мл). Культивування здійснювали у 750 мл
колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж
120 год.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини, екс-
траговані з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлоро-
форм і метанол, 2:1), як описано у наших попередніх роботах [2, 14].

Як тест-культури під час визначення антимикробних властивостей ПАР
використовували штами бактерій (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis*
БТ-2) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6) з колекції живих культур кафе-
дри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових
технологій.

Антимикробні властивості поверхнево-активних речовин аналізува-
ли за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначен-
ня МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-
пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі – для дріжджів,
як описано нами раніше [2]. Результати оцінювали візуально за помут-
нінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння се-
редовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній).
Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як середнє
значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був від-
сутній, і в попередній, де він був наявний.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину центри-
фугували (5000 г, 20 хв, 4 °С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від

залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 20 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4°С), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ферментів визначали, як описано у нашій праці [5]. Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) встановлювали за швидкістю утворення фенілгідразону гліюксилату при 324 нм, фосфоенолпіруват (ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2) – за швидкістю утворення пірувату, яку аналізували за окисненням НАДН при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксікінази (КФ 4.1.1.49) – за утворенням ФЕП та пірувату у процесі окиснення НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) – за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм, ФЕП-карбоксілази (КФ 4.1.1.31) – за окисненням НАДН при 340 нм.

Під час дослідження впливу катіонів на активність $НАДФ^+$ -залежної глутаматдегідрогенази у реакційну суміш вносили 0,001–0,01 мМ Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} у вигляді розчинів солей $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ та $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Активність ферментів виражали у нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [8]. Активність ферментів аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Усі досліді проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за Лакінім [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Критерієм активності того чи іншого препарату з антимікробними властивостями є мінімальна інгібуюча концентрація – найменша концентрація препарату, що пригнічує видимий неозброєним оком ріст тест-культури [7]. МІК є незалежним показником, за допомогою якого можна одночасно порівняти ефективність кількох антимікробних агентів. На відміну від інших методів аналізу активності відповідних препаратів, визначення МІК має ряд переваг: простота і швидкість аналізу, можливість одночасного визначення для кількох тест-культур, дослідження ефективності різних концентрацій препарату, можливість порівняння ефективності різних препаратів чи препаратів різного ступеня очищення [7].

Визначення МІК є важливим фактором у лабораторній діагностиці для виявлення стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів, а також для контролю ефективності нових лікарських засобів. У медичній практиці за допомогою цього показника обирають антибіотики та встановлюють необхідні їх дози для лікування пацієнтів [12].

У табл. 1 наведено мінімальні інгібуючі концентрації щодо досліджуваних тест-культур поверхнево-активних речовин, синтезованих за умов росту штаму ІМВ В-7405 на етанолі, гліцерині та *n*-гексадекані за наявності дріжджового автолізу та суміші мікроелементів або певних мікроелементів. Ці дані засвідчують, що незалежно від природи джерела вуглецю у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241, ПАР, синтезовані у

середовищі з дріжджовим автолізатом і мікроелементами, є ефективнішими антимікробними агентами порівняно з ПАР, утворюваними на середовищі з сульфатом міді і сульфатом заліза (або сульфатом міді, сульфатом цинку і хлоридом калію): МІК (мкг/мл) щодо досліджуваних бактерій становить 9–34 і 18–75, дріжджів – 9–68 і 34–75 відповідно.

Таблиця 1

Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих у різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Тест-культури	МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих за наявності у середовищі з					
	етанолом		<i>n</i> -гексадеканом		гліцерином	
	дріжджового автолізату, мікроелементів	CuSO ₄ ·5H ₂ O, FeSO ₄ ·7H ₂ O	дріжджового автолізату, мікроелементів	CuSO ₄ ·5H ₂ O, FeSO ₄ ·7H ₂ O	дріжджового автолізату, мікроелементів	CuSO ₄ ·5H ₂ O, ZnSO ₄ ·7H ₂ O, KCl
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (14 год)	9	18	27	71	9	38
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (24 год)	9	18	27	71	34	75
<i>E. coli</i> ІЕМ-1	20	70	27	36	34	75
<i>C. albicans</i> Д-6	9	34	54	71	68	75

Примітка: Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %

Результати досліджень, наведені у табл. 1 показують також, що антимікробні властивості ПАР залежать не тільки від наявності у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 факторів росту і певних мікроелементів, а й від природи джерела вуглецевого живлення. Так, найефективнішими антимікробними агентами виявилися ПАР, синтезовані на етанолі за наявності дріжджового автолізату і мікроелементів (МІК 9–20 мкг/мл), у той час як мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, отриманих в аналогічних умовах культивування на гліцерині і *n*-гексадекані, була вищою і становила 9–68 і 27–54 мкг/мл відповідно.

Одержані результати корелюють з нашими попередніми даними дослідження впливу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на адгезію мікроорганізмів до абіотичних поверхонь [4]. Найвищі антиадгезивні властивості виявляли ПАР, синтезовані за наявності в етанол-, гліцерин- та *n*-гексадеканвмісних середовищах дріжджового автолізату та мікроелементів. Крім того, після обробки поверхонь препаратами ПАР, синтезованими на етанолі з дріжджовим автолізатом і мікроелементами, спостерігали зниження адгезії тест-культур у середньому на 60–80 %, у той час як обробка матеріалів препаратами, одержаними в аналогічних умовах

культивування на гліцерині та *n*-гексадекані супроводжувалася зниженням адгезії мікроорганізмів у середньому на 40–70 і 40–50 % відповідно, порівняно з адгезією на необроблених ПАР поверхнях [4].

Аналіз літературних даних показав, що мінімальна інгібуюча концентрація ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо бактерій є значно нижчою, ніж МІК гліколіпідів, синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* MR01 та *P. aeruginosa* MASH1 [10], а також софороліпідів дріжджів роду *Candida* [15]. Так, МІК поверхнево-активних речовин штамів MR01 та MASH1 щодо бактерій родів *Escherichia* та *Bacillus* становить 128 та 512 мкг/мл відповідно [10], а МІК софороліпідів *Candida bombicola* D17 щодо *B. subtilis* – 290–320 мкг/мл [15]. В огляді [9] наведено МІК (мкг/мл) рамноліпідів щодо *B. subtilis* – 10–35, софороліпідів щодо *E. coli* – понад 512, манозилеритритолліпідів щодо *C. albicans* – 40.

Раніше [2] нами було встановлено, що МІК поверхнево-активних речовин, синтезованих ізольованим нами штамом *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на гліцерині, перебувала у межах (мкг/мл): щодо *B. subtilis* БТ-2 – 11,5–22,5, *E. coli* ІЕМ-1 – 85, *C. albicans* Д-6 – 11,5.

Зазначимо, що лише у праці [17] автори досліджували вплив природи джерела вуглецю у середовищі культивування *Bacillus* sp. AR2 на антимікробні властивості синтезованих ПАР. Показано, що мінімальна інгібуюча концентрація щодо мікроміцетів ліпопептидів, синтезованих на сорбітолі, лактозі, мальтозі становила 250–2000 мкг/мл, у той час як МІК ліпопептидів, утворюваних на середовищі з сахарозою, декстрозою та гліцерином була значно нижчою (125–750 мкг/мл) [17].

Наступний етап наших досліджень був присвячений встановленню причин, що зумовлюють різні біологічні властивості ПАР, синтезованих у середовищі з факторами росту та без них. Оскільки штам ІМВ В-7241 синтезує комплекс гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів [14], ми припустили, що в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 може змінюватися співвідношення компонентів комплексу. За літературними даними [9, 16, 18] аміноліпіди є ефективнішими антимікробними агентами порівняно з гліколіпідами. Отже, цілком ймовірно, що за наявності у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 дріжджового автолізу та суміші мікроелементів, вміст аміноліпідів у складі синтезованого комплексу ПАР є вищим, ніж у одержаного на середовищі з сульфатом міді і сульфатом заліза (або сульфатом міді, сульфатом цинку і хлоридом калію). Крім того, можна припустити, що серед мікроелементів-складових середовища для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, є катіони, що слугують активаторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів у даного штаму [6].

Для перевірки цього припущення аналізували активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази і ферментів біосинтезу гліколіпідів (ФЕП-карбоксиказа та ФЕП-синтегаза) [6] у різних умовах вирощування штаму ІМВ В-7241, а також вплив Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (табл. 2 і 3).

Дані, наведені у табл. 2, засвідчують, що, незалежно від природи джерела вуглецю за наявності у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 дріжджового автолізу та суміші мікроелементів, активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази була у 1,7–1,8 разів вищою, а

активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних гліколіпідів і відповідної анаплеротичної ФЕП-карбоксилазної реакції – нижчою, ніж за умов росту на середовищі з певними катіонами.

Таблиця 2

Активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин у *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених за наявності у середовищі з					
	етанолом		<i>n</i> -гексадеканом		гліцерином	
	дріжджового автолізу, мікроелементів	CuSO ₄ , FeSO ₄	дріжджового автолізу, мікроелементів	CuSO ₄ , FeSO ₄	дріжджового автолізу, мікроелементів	CuSO ₄ , ZnSO ₄ , KCl
ФЕП-карбоксикіназа	2500±125	1300±65	1878±93	1467±73	1990±99	1200±60
ФЕП-синтегаза	8235±411	5294±264	6500±325	3450±172	7570±378	4650±232
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	610±30	345±17	397±19	234±11	395±19	220±11
ФЕП-карбоксилаза	6250±312	2000±100	4500±225	3600±180	5500±275	2950±147
Ізоцитратгіаза	22±1	24±1	0	0	0	0

Примітка: Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених до кінця експоненційної фази росту

Підвищення за наявності катіонів цинку активності НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази у безклітинному екстракті, одержаному з клітин, вирощених на етанолі та *n*-гексадекані (табл. 3), дає змогу припустити, що внесення Zn²⁺ у середовище з сульфатом міді і сульфатом заліза, буде супроводжуватися посиленням синтезу поверхнево-активних аміноліпідів, а отже, й підвищенням антимікробної активності синтезованих ПАР. У той же час нам не вдалося виявити катіони, які б слугували активаторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на гліцерині (див. табл. 3). Можливо, що такими потенційними активаторами цього ферменту є певні компоненти дріжджового автолізу. Перевірка цих гіпотез буде предметом наших подальших досліджень.

Таким чином, результати даної роботи узгоджуються з даними, наведеними раніше [4] про залежність біологічних властивостей ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 від умов культивування продуцента і засвідчують необхідність проведення таких досліджень з метою одержання препаратів з стабільними заданими властивостями залежно від галузі їх практичного використання.

**Вплив двовалентних катіонів на активність НАДФ⁺-залежної
глутаматдегідрогенази *A. calcoaceticus* IMB В-7241**

Ростовий субстрат	Катіони	Кон-ція катіонів, мМ	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)
Гліцерин	Fe ²⁺	0,001	210±11
		0,005	200±10
		0,01	215±11
	Mn ²⁺	0,001	196±10
		0,005	210±11
		0,01	200±10
	Co ²⁺	0,001	190±10
		0,005	200±10
		0,01	205±10
	Без катіонів (контроль)		
Етанол	Zn ²⁺	0,001	580±29
		0,005	580±29
		0,01	397±19
	Mn ²⁺	0,001	340±17
		0,005	344±17
		0,01	310±15
	Co ²⁺	0,001	340±17
		0,005	344±17
		0,01	345±17
	Без катіонів (контроль)		
н-Гексадекан	Zn ²⁺	0,001	400±20
		0,005	395±20
		0,01	260±13
	Mn ²⁺	0,001	230±11
		0,005	235±11
		0,01	240±12
	Co ²⁺	0,001	250±12
		0,005	240±17
		0,01	245±12
	Без катіонів (контроль)		

Примітки: У середовище культивування з етанолом (гексадеканом) вносили CuSO₄·5H₂O та FeSO₄·7H₂O, з гліцерином – CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O та KCl. У реакційну суміш добавляли ті катіони зі складу мікроелементів, які не вносили у середовище культивування штаму IMB В-7241. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених до кінця експоненційної фази росту

**Т.П. Пироз^{1,2}, И.В. Савенко¹, Т.А. Шевчук²,
Н.В. Крутоус¹, Иутинская Г.А.²**

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB В-7241

Резюме

Цель. Исследование антимикробных свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 в зависимости от наличия дрожжевого автолизата и микроэлементов в составе этанол-, *n*-гексадекан- и глицеринсодержащих сред. **Методы.** Антимикробные по отношению к бактериям (*Escherichia coli* ИЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2) и дрожжам (*Candida albicans* Д-6) свойства ПАВ определяли по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК). ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). **Результаты.** Исключение из состава среды культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов, и замена их на сульфат меди и сульфат железа в среде с этанолом и *n*-гексадеканом, а в среде с глицерином – на хлорид калия, сульфат цинка и сульфат меди сопровождалась снижением антимикробных свойств ПАВ. Наиболее эффективными антимикробными агентами оказались ПАВ, синтезированные на этаноле при наличии дрожжевого автолизата и микроэлементов (МИК 9–20 мкг/мл), в то время как ПАВ, полученные в аналогичных условиях культивирования на глицерине и *n*-гексадекане, ингибировали рост исследуемых бактерий и дрожжей при более высоких (9–68 и 27–54 мкг/мл соответственно) концентрациях. Показатель минимальной ингибирующей концентрации ПАВ, синтезированных в среде с этанолом (глицерином, *n*-гексадеканом), дрожжевым автолизатом и микроэлементами, коррелировал с активностью НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента биосинтеза аминокислот (610±30, 395±24, 397±24 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). **Выводы.** Более высокая активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы при выращивании штамма IMB B-7241 в среде с этанолом (*n*-гексадеканом), дрожжевым автолизатом и микроэлементами по сравнению с таковой в среде с сульфатом меди и сульфатом железа, а также увеличение активности фермента при наличии Zn²⁺ свидетельствует о возможности усиления синтеза аминокислот при внесении в среду с этанолом (*n*-гексадеканом) катионов цинка. Полученные данные свидетельствуют также о необходимости исследований влияния условий культивирования продуцента на биологические свойства синтезированных ПАВ.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, условия культивирования, антимикробные свойства

**T.P. Pirog^{1,2}, I.V. Savenko¹, T.A. Shevchuk²,
N.V. Krutous¹, G.O. Iutynska²**

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

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

ANTIMICROBIAL PROPERTIES SURFACTANTS SYNTHESIZED UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241

Summary

Aim. To study the antimicrobial properties of the surface-active agents (surfactants) *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 depending on the availability of yeast autolysate and trace elements in the composition of ethanol-, *n*-hexadecane- and glycerol-containing

media. **Methods.** Antimicrobial against bacteria (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2), and yeast (*Candida albicans* D-6) properties of the surfactant was determined by index of the minimum inhibitory concentration (MIC). Surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2:1). **Results.** The removal from cultivation medium yeast autolysate and trace element mix and replacing them by copper sulfate and iron sulphate in the medium with ethanol and n-hexadecane, and in the medium with glycerol – by potassium chloride, zinc sulfate and copper sulfate accompanied by decreasing antimicrobial properties of surfactants. The most effective antimicrobial agents were surfactant synthesized on ethanol in the presence of yeast autolysate and trace elements (MIC 9–20 μ /ml), whereas the surfactant obtained under similar cultivation conditions on glycerol and n-hexadecane, inhibited growth of tested bacteria and yeast at higher (9–68 and 27–54 μ /ml, respectively) concentrations. The minimum inhibitory concentration of surfactant, synthesized in a medium with ethanol (glycerol, n-hexadecane), yeast autolysate and trace elements, correlated with the activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase – a key enzyme of aminolipids biosynthesis (610 \pm 30, 395 \pm 24, 397 \pm 24 nM min⁻¹·mg⁻¹ protein, respectively). **Conclusions.** The higher activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase when growing the strain IMV B-7241 in a medium with ethanol (n-hexadecane), yeast autolysates and trace elements compared to that in a medium with copper sulfate and iron sulfate, as well as an increase enzyme activity in the presence of zinc cations suggests the possibility of increasing synthesis aminolipids by introducing Zn²⁺ in the medium with ethanol and n-hexadecane. The obtained data indicate the need for studies depending on biological properties of surfactants of the cultivation conditions of producer.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, surfactants, conditions of cultivation, antimicrobial properties

1. Лакін Г.Ф. Биометрия – М.: Высшая школа –1990. – 352 с.
2. Пирог Т.П., Берегова Х.А., Савенко І.В., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Nocardia vacciniі* IMB B-7405 // Мікробіол. журнал. – 2015. – 77, № 6. – С. 2–10.
3. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софілканіч А.П., Скочко А.Б. Дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на деякі мікроорганізми // Мікробіол. журнал. – 2011. – 73, № 3. – С. 14–20.
4. Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ // Мікробіол. журнал. – 2016. – 78, № 1. – С. 2–12.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Берегова Х.А., Кудря Н.В. Особливості метаболізму глюкози і гліцеролу у *Nocardia vacciniі* IMB B-7405 – продуцента поверхнево-активних речовин // Ukr. Biochem. J. – 2015. – 87, № 2. – С. 66–75.
6. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Мащенко О.Ю., Парфенюк С.А., Іутинська Г.А. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // Микробиол. журнал. – 2013. – 75, № 5. – С. 19–27.
7. Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations // J. Antimicrob. Chemother. – 2001. – 48, N 1. – P. 5–16.

8. *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 3. – P. 248–254.
9. *Cortes-Sanchez A., Hernandez-Sanchez H., Jaramillo-Flores M.* Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives // *Microbiol. Rec.* – 2013. – **168**, N 1. – P. 22–32.
10. *Lotfabad B., Shahcheraghi F., Shooraj F.* Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains // *Jundishapur J. Microbiol.* – 2013. – **6**, N 1. – P. 29–35.
11. *Mandal S.M., Barbosa A.E., Franco O.L.* Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – **31**, N 5. – P. 338–345. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.
12. *Mazzola P.G., Jozala A.F., Novaes L.C.L., Moriel P., Penna T.C.V.* Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2009. – **45**, N 2. – P. 241–248. doi: org/10.1590/S1984-82502009000200008.
13. *Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., Garcí'a F., Manresa A.* Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // *Langmuir.* – 2001. – **17**, N 5. – P. 1367–1371.
14. *Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanich A.P., Iutinskaya G.A.* Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2013. – **49**, N 4. – P. 360–367.
15. *Rufino R., Luna J., Sarubbo L., Rodrigues L., Teixeira J., Campos-Takaki G.* Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactants produced by *Candida species* // *Curr. Microbiol.* – 2012. – **24**, N 8. – P. 245–256. doi: 10.5772/52578.
16. *Sharma D., Mandal S.M., Manhas R.K.* Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *AMB Express.* – 2014. – 4:50. doi: 10.1186/s13568-014-0050-y.
17. *Singh A.K., Rautela R., Cameotra S.S.* Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2 // *Microb. Cell. Fact.* – 2014. – 13:67. – doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
18. *Tareq F.S., Lee M.A., Lee H.S., Lee J.S., Lee Y.J., Shin H.J.* Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis* // *Mar. Drugs.* – 2014. – **12**, N 2. – P. 871–885.
19. *Vollbrecht E., Rau U., Lang S.* Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella spec* // *Lipid / Fett.* – 1999. – **101**, N 10. – P. 389–394.

Отримано 28.10.2015