

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог^{2,2}, А.Д. Конон¹, А.П. Софилканич¹, Т.А. Шевчук², С.А. Парфенюк¹

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

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ Cu^{2+} НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* *IMB B-7241* И *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB Ac-5017*

Исследовали синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017* и *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241* на гидрофобных (*n*-гексадекан, жидкие парафины, подсолнечное масло) и гидрофильных (этанол) субстратах в зависимости от концентрации (0,01–0,5 мМ) и момента внесения в среду катионов меди.

Установлено, что добавление Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста штаммов *IMB B-7241* и *IMB Ac-5017* на всех исследуемых субстратах сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 25–140 % по сравнению с показателями на среде без катионов меди. Максимальная интенсификация синтеза ПАВ *A. calcoaceticus IMB B-7241* и *R. erythropolis IMB Ac-5017* наблюдалась при внесении Cu^{2+} в среду с углеводородами.

Повышение синтеза ПАВ в присутствии катионов меди обусловлено их активирующим влиянием на активность алкангидроксилазы обоих штаммов, а также 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин-зависимой алкогольдегидрогеназы и ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (фосфоенолпируват-синтетаза) и аминоклипов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа) у *A. calcoaceticus IMB B-7241*.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241*, *Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017*, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, тяжелые металлы, катионы меди.

Ранее мы сообщали о способности изолированных нами штаммов *Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017* и *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241* синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ) при культивировании на гидрофильных и гидрофобных субстратах: *n*-гексадекан, жидкие парафины, этанол, глюкоза, глицерин [1, 3, 9]. В дальнейших исследованиях была показана возможность интенсификации синтеза ПАВ штаммами *IMB B-7241* и *IMB Ac-5017* при внесении в среду с этанолом (*n*-гексадеканом, глицерином) органических кислот [2, 5, 11], использовании смешанных энергетически неравноценных ростовых субстратов [10, 11] и масштабировании процесса на ферментационное оборудование [8].

Установлено, что препараты ПАВ *R. erythropolis IMB Ac-5017* и *A. calcoaceticus IMB B-7241* повышают степень деструкции нефтяных загрязнений в воде и почве [4], а также обладают антимикробными свойствами [6, 7].

Из литературы известно, что микробные поверхностно-активные вещества (рамноляпины, софоролипины, липопептиды) характеризуются также способностью к образованию стабильных комплексов с тяжелыми токсичными металлами (Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}), благодаря чему защищают клетки продуцента от их действия, а также могут использоваться в природоохраных технологиях для удаления металлов [16, 18, 20, 21, 26].

Цель данной работы – исследовать рост и синтез ПАВ при культивировании *R. erythropolis IMB Ac-5017* и *A. calcoaceticus IMB B-7241* на средах с различными источниками углерода в присутствии катионов меди.

© Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.П. Софилканич, Т.А. Шевчук, С.А. Парфенюк, 2013

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

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

A. calcoaceticus ИМВ В-7241 культивировали на среде такого же состава за исключением источника азота: вместо NaNO_3 в среду вносили $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ в концентрации 0,35 г/л. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [3]).

В качестве источника углерода и энергии использовали этанол, *n*-гексадекан, жидкие парафины (C_{10} – C_{18}), а также подсолнечное масло в концентрации 2 % (по объему). При культивировании *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с подсолнечным маслом в среду дополнительно вносили 0,1 % глюкозы.

В начале процесса культивирования, в экспоненциальной и стационарной фазе роста штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 в среду вносили Cu^{2+} (0,01–0,5 мМ) в виде 1М раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

В процессе культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 pH поддерживали на уровне 7,0 периодическим подщелачиванием 1 н раствором КОН.

Посевной материал – культура из середины экспоненциальной (48–60 ч) или стационарной (120 ч) фазы роста, выращенная на средах указанного выше состава в присутствии или отсутствии Cu^{2+} . В качестве источника углерода и энергии при получении инокулята использовали этанол, *n*-гексадекан, жидкие парафины (0,5 % по объему) или глюкозу (0,5 %).

Количество инокулята – 5 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл). Культивирование осуществляли в 750 мл колбах со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 24–120 ч.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %) определяли, как описано в наших предыдущих работах [1–3, 5, 9–11].

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

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

Активность алкангидроксилазы (КФ 1.14.15.3), никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) -алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) и фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2) анализировали согласно [2, 5, 10, 11]. При исследовании влияния катионов меди на активность ферментов в реакционную смесь вносили 0,01; 0,05 и 0,1 мМ Cu^{2+} в виде 5 %-ного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Т.П. Пирог^{1,2}, А. Д. Конон¹, А.П. Софілканич¹, Т.А. Шевчук², С.А. Парфенюк¹

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ

ВПЛИВ Cu^{2+} НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 і *RHODOCOCCUS* *ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017

Резюме

Досліджували синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на гідрофобних (*n*-гексадекан, рідкі парафіни, соняшникова олія) і гідрофільних (етанол) субстратах залежно від концентрації (0,01–0,5 мМ) та моменту внесення у середовище катіонів міді.

Встановлено, що додавання Cu^{2+} в експоненційній фазі росту штамів IMB B-7241 та IMB Ac-5017 на всіх досліджуваних субстратах супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР на 25–140 % порівняно з показниками на середовищі без катіонів міді. Максимальна інтенсифікація синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 спостерігалася у разі внесення Cu^{2+} у середовище з вуглеводнями.

Підвищення синтезу ПАР за присутності катіонів міді зумовлене їх активуючим впливом на активність алкангідроксилази обох штамів, а також 4-нітросо-N,N-диметиланілін-залежної алкогольдегідрогенази та ферментів біосинтезу поверхнево-активних гліко-(фосфоенолпіруват-синтетаза) та аміноліпідів (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) у *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, важкі метали, катіони міді

T.P. Pirog^{1,2}, A.D. Konon¹, A.P. Sofilkanych¹, T.A. Shevchuk², S.A. Parfenyuk¹

¹National University of Food Technologies, Kyiv

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

EFFECT OF Cu^{2+} ON SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 AND *RHODOCOCCUS* *ERYTHROPOLIS* IMV Ac-5017

Summary

Synthesis of biosurfactants (surface-active substances, SAS) was investigated under the conditions of growth of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on hydrophobic (*n*-hexadecane, liquid paraffins, sunflower oil) and hydrophilic (ethanol) substrates depending on concentration (0.01–0.5 mM) and time of copper cations introduction in the medium.

It is established that Cu^{2+} addition in the exponential phase of growth of the strains IMV B-7241 and IMV Ac-5017 on all studied substrates was accompanied by the increase of conventional concentration of SAS by 25–140 % as compared with the indices in the medium without copper cations. Maximum synthesis intensification of SAS of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 was observed in the case of Cu^{2+} introduction in the medium with hydrocarbons.

The increase of SAS synthesis in the presence of copper cations is determined by their activating effect on activity of alkane hydroxylase of the both strains, as well as 4-nitroso-N,N-dimethylaniline-dependent alcohol dehydrogenase and enzymes of biosynthesis of surface active glyco-(phosphoenolpyruvate-synthetase) and aminolipids (NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase) in *A. calcoaceticus* IMV B-7241.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, intensification of biosynthesis, biosurfactants, heavy metals, copper cations.

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

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 5. – С.544–550.
2. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. – 2008. – 77, № 6. – С. 749–757.
3. 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. – 45, № 3. – С. 304–310.
4. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокина А.И. Вплив поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на ефективність мікробної деструкції нафтових забруднень // Мікробіол. журн. – 2009. – 71, № 5. – С. 8–13.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на н-гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – 46, № 6. – С. 651–658.
6. Пирог Т.П., Конон А.Д., Скочко А.Б. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині // Біотехнологія. – 2011. – 4, № 2. – С.24–38.
7. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софілканіч А.П., Скочко А.Б. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, № 3. – С. 14–20.
8. Пирог Т.П., Игнатенко С.В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на н-гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – 47, № 4. – С.436–442.
9. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.
10. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Білець І.В. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на смеси н-гексадекана и глицерина // Микробиология. – 2012. – 81, №5. – С. 611–618.
11. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Шулякова М.О. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на глицерині // Біотехнологія. – 2012. – 5, №4. – С. 88–95.
12. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
13. Ascı Y., Nurbas M., Sag Acikel Y. Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant // J. Environ. Manag. – 2010. – 91, N 3. – P. 724–731.
14. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 87, N 2. – P. 427–444.
15. Cserhati T., Forgacs E., Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants // Environ. Int. – 2002. – 28, N 5. – P. 337–348.
16. Dahrazma B., Mulligan C.N. Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration // Chemosphere. – 2007. – 69, N5. – P. 705–711.
17. Hazra C., Kundu D., Ghosh P., Joshi S., Dandi N., Chaudhari A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2011. – 86, N 1. – P. 185–198.

18. Jayabarath J., Sundar S.S., Arulmurugan R., Giridhar R. Bioremediation of heavy metals using biosurfactants // Int. J. Biotechnol. Appl. – 2009. – 1, N 2. – P. 50–54.
19. Kopecky J., Nguyen K.T., Nguyen L.T., Behal V. Properties of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from the tylosin producer *Streptomyces fradiae* // Can. J. Microbiol. – 1997. – 43, N 11. – P. 1005–1010.
20. Mulligan C.N., Yong R.V., Gibbs B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants // J. Haz. Materials. – 2001. – 85, N 1–2. – P. 111–125.
21. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // Environ. Pollution. – 2005. – 133, N 2. – P. 183–198.
22. Orell A., Navarro C.A., Arancibia R., Mobarec J.C., Jerez C.A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals // Biotechnol. Adv. – 2010. – 28. – P. 839–848.
23. Oshoa-Losa F.J., Artiola J.F., Maier R.M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant // J. Environ. Qual. – 2001. – 30, N 2. – P. 479–485.
24. Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – 34, N 6. – P. 1037–1062.
25. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Methanotrophs and copper // Ibid. – 2010. – 34, N. 4. – P. 496–531.
26. Singh P., Cameotra S.S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – 319, N 2. – P. 291–297.
27. Torres Pazmino D.E., Winkler M., Glieder A., Fraaije M.W. Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications // J. Biotechnol. – 2010. – 146, N 1–2. – P. 9–24.
28. van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J.A. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // Eur. J. Biochem. – 1993. – 212, N 3. – P. 819–826.
29. Wang S., Mulligan C.N. Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailing // Process Biochemistry. – 2009. – 44, N 1. – P. 296–301.

Отримано 12.01.2012