

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², А.Д. Конон¹,
М.А. Шулякова¹, Г.А. Иутинская²

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

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 И *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017 В СРЕДЕ С ГЛИЦЕРИНОМ

Установлена возможность использования в качестве субстрата для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 побочного продукта производства биодизеля.

Максимальные показатели синтеза ПАВ штаммом ИМВ В-7241 зафиксированы при наличии в среде с глицерином дрожжевого автолизата и микроэлементов. Показана возможность интенсификации синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси гексадекана и глицерина в концентрации 0,5–1,0 % (по объему). При использовании инокулята, выращенного на гексадекане, условная концентрация ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смешанном субстрате была на 56–100, а *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – на 260–320 % выше, чем на моносубстрате глицерине.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, глицерин, смешанные субстраты.

В предыдущих исследованиях [1] нами была показана возможность синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Nocardia vaccinii* К-8 на глицерине. Интерес к глицерину как субстрату для микробного синтеза обусловлен тем, что в последние годы в связи с расширением производства биодизеля в мире этот спирт из разряда «целевых» технологических продуктов перешел в категорию отходов. Такое положение дел стало причиной серьезных изменений во многих отраслях промышленности. Так, например, Procter and Gamble и другие косметические компании прекратили выпуск собственного глицерина [18]. Сверхбыстрое увеличение производства биодизеля создало избыток технического глицерина (побочного продукта трансэтерификации растительных масел и животных жиров), что привело к снижению цены на этот продукт в 10 раз только за последние годы [18].

На сегодняшний день около 80 % получаемого в мире биодизеля производится в странах Европейского союза [3]. Основным сырьем для его получения в Европе является рапсовое масло. Одним из альтернативных путей утилизации глицерина – побочного продукта производства биодизеля – является его использование в технологиях микробного синтеза практически ценных продуктов [3, 18].

Ранее мы сообщали о способности изолированных нами штаммов *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ) при культивировании на гидрофильных и гидрофобных субстратах: гексадекан, жидкие парафины, этанол, глюкоза [14, 15].

Цель данной работы – исследовать возможность использования глицерина для получения ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы *A. calcoaceticus* К-4 и *R. erythropolis* ЭК-1, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного 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 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ в концентрации 0,35 г/л. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [15]), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001.

В качестве источника углерода и энергии использовали глицерин в концентрации 0,5–2,04 % (по объему), *n*-гексадекан – 0,5–1,98 % (по объему), этанол – 1 %, а также смесь *n*-гексадекана и глицерина в концентрации 0,5–1,0 %.

Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48–60 ч), выращенная на средах указанного выше состава. В качестве источника углерода и энергии при получении инокулята использовали глицерин, *n*-гексадекан, этанол в концентрации 0,5 %, а также смесь *n*-гексадекана (0,25 %) и глицерина (0,25 %). Среда для получения посевного материала *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, содержала также (в различных комбинациях) дрожжевой автолизат – 0,5 %, раствор микроэлементов – 0,1 % и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 г/л.

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 (220 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, 14, 15].

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 глицерином или этанолом, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (рН 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (рН 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40–60 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 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, рН 7,0. Отмытые клетки суспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере, рН 7,0, после чего разрушали ультразвуком как описано выше.

Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) измеряли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-N,N-диметиланилина (НДМА) при 440 нм с этанолом, *n*-гексадеканолом и глицерином как донорами электронов как описано ранее [2]. Активность глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпируват(ФЕП)-синтазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49) и ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) анализировали согласно [2].

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [1, 14, 15]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследование роста и образования ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с глицерином показало, что штаммы способны ассимилировать этот субстрат и синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами (табл. 1). При повышении содержания глицерина в среде культивирования обоих штаммов условная концентрация ПАВ увеличивалась, однако была ниже, чем на гексадекане или этаноле [14, 15], а также в 1,6–1,8 раза ниже, чем у штамма *Nocardia vaccinii* К-8, растущего на глицерине [1]. В связи с этим следующий этап исследований был посвящен поиску путей повышения синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с глицерином.

Ранее нами было показано, что при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на этаноле показатели синтеза ПАВ увеличивались при наличии в среде дрожжевого автолизата и микроэлементов [15]. Поэтому исследовали образование ПАВ штаммом ИМВ В-7241 на среде с глицерином, в которую вносили дрожжевой автолизат, микроэлементы и сульфат железа (табл. 2). Исследование роли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в синтезе ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241

обусловлено тем, что в присутствии сульфата железа в среде с глицерином наблюдали максимальные показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 [1]. Отметим, что существенное повышение синтеза ПАВ штаммом К-8 имело место при внесении $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в среду как для получения инокулята, так и для синтеза поверхностно-активных веществ. В наших первых экспериментах с *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с сульфатом железа выращивали только посевной материал.

Таблица 1

Рост и синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241
и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на глицерине

Штамм	Концентрация глицерина, %	Биомасса, г/л	ПАВ*	E_{240} , %
<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	0,5	0,5±0,02	1,5±0,07	39±3
	1,0	0,8±0,04	2,4±0,12	36±4
<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017	0,5	1,2±0,06	2,0±0,10	37±2
	1,0	1,5±0,07	2,5±0,12	47±2

Примечания. Посевной материал выращен на среде с 0,5 % глицерина и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Среда для культивирования штамма ИМВ В-7241 содержала дрожжевой автолизат и микроэлементы. Табл. 1, 2, 4 и 5: продолжительность культивирования 120 ч.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, исключение $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ из состава среды для получения инокулята сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ, причем, независимо от способа подготовки посевного материала, показатели синтеза ПАВ при культивировании штамма ИМВ В-7241 на среде с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ были ниже, чем на среде без сульфата железа. Наиболее высокое значение показателя условной концентрации ПАВ (3,2) зафиксировано при выращивании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с глицерином, дрожжевым автолизатом и микроэлементами (табл. 2).

Таблица 2

Влияние дрожжевого экстракта, микроэлементов и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
на синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241

Наличие в среде культивирования			ПАВ*	
дрожжевого автолизата	микроэлементов	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	I	II
+	+	-	2,4±0,12	3,2±0,16
-	+	-	2,1±0,10	2,6±0,13
+	-	-	2,6±0,13	2,8±0,14
-	-	+	1,8±0,09	2,0±0,10
+	+	+	1,9±0,09	2,3±0,11
-	+	+	1,7±0,08	2,1±0,10
+	-	+	1,6±0,08	2,2±0,11

Примечания. Концентрация глицерина в среде для получения инокулята 0,5, в среде для биосинтеза - 1 %. Инокулят выращен на среде с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (I) и без $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (II).

Отметим, что наличие сульфата железа в среде для получения инокулята и биосинтеза ПАВ не влияло на концентрацию биомассы *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241. Эти результаты могут свидетельствовать об ингибировании катионами железа ферментов биосинтеза ПАВ у штамма ИМВ В-7241, что было подтверждено в наших дальнейших экспериментах (табл. 3). Так, в присутствии 0,1 мМ сульфата железа наблюдали снижение в 1,4–1,7 раза активности всех исследуемых ферментов биосинтеза аминокислот и гликолипидов у штамма В-7241, кроме ФЕП-синтетазной активности, которая в таких условиях повышалась в 1,4 раза. Однако отметим, что при наличии в реакционной смеси 0,5 мМ сульфата железа активность этого фермента также снижалась (табл. 3). Повышение концентрации $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ до 0,5–1,0 мМ сопровождалось 100 %-ным ингибированием активности ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы. В присутствии 1,0 мМ сульфата железа ингибировалась полностью и активность глутаматдегидрогеназы.

манноза и эритритол могут служить предшественниками синтеза целевого продукта, каковым являются поверхностно-активные маннозилэритритоллипиды.

Отметим, что представленные в данной работе исследования по синтезу ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси гексадекана и глицерина также являются в какой-то мере эмпирическими. Ведь при культивировании на смешанных субстратах для обеспечения максимальной конверсии углерода в целевой продукт необходимо установление оптимального для его синтеза молярного соотношения концентраций моно субстратов в смеси [2]. А это в свою очередь требует проведения теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза ПАВ и биомассы на энергетически дефицитном субстрате с последующим определением концентрации энергетически избыточного субстрата, восполняющей энергетические расходы на этот процесс, как было установлено нами ранее для микробного полисахарида этаполана [2]. Для осуществления таких теоретических расчетов необходимо знать пути метаболизма соответствующих моно субстратов у продуцентов ПАВ. Такая работа с *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 нами уже начата [2], и мы надеемся в обозримом будущем успешно завершить комплекс исследований, обеспечивающих максимальную трансформацию углерода глицерина и гексадекана в поверхностно-активные вещества при культивировании штаммов ИМВ В-7241 ИМВ Ас-5017 на их смеси.

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², А.Д. Конон¹, М.О. Шулякова¹, Г.О. Іутинська²

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB В-7241 І RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB Ас-5017 У СЕРЕДОВИЩІ З ГЛІЦЕРИНОМ

Встановлено можливість використання як субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 гліцерину – побічною продукту виробництва біодизелю.

Максимальні показники синтезу ПАР штамом IMB В-7241 зафіксовані за наявності у середовищі з гліцериним дріжджового автолізу та мікроелементів. Показано можливість інтенсифікації синтезу ПАР під час культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на суміші гексадекану і гліцерину у концентрації 0,5–1,0 % (об'ємна частка). За використання інкуляту, вирощеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на змішаному субстраті була на 56–100, а *R. erythropolis* IMB Ас-5017 – на 260–320 % вищою, ніж на моно субстраті гліцерині.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, гліцерин, змішані субстрати.

Т.Р. Pirog^{1,2}, Т.А. Shevchuk², А.Д. Konon¹, М.А. Shulyakova¹, G.A. Iutinskaya²

¹National University of Food Technologies, Kyiv

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,

National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

SYNTHESIS OF SURFACTANTS ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV В-7241 AND RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMV Ас-5017 IN THE MEDIUM WITH GLYCEROL

Summary

It was established that glycerol, a byproduct of biodiesel production, may be used as substrate for synthesis of surfactants *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV В-7241.

Maximum indices of surfactants synthesis by the strain IMV В-7241 have been fixed, when the medium with glycerol included yeast autolysate and trace elements. It was shown that the surfactants synthesis could be intensified when cultivating *A. calcoaceticus* IMV В-7241 and *R. erythropolis* IMV Ас-5017 on the mixture of hexadecane and glycerol in concentration of 0.5-1.0 % (in volume). When using inoculate grown on hexadecane, the conditional concentration of the surfactant *A. calcoaceticus* IMV В-7241 on the mixed substrate was higher by 56-100, and that of *R. erythropolis* IMV Ас-5017 by 260-320 % than on the monosubstrate glycerol.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, intensification of biosynthesis, surfactants, glycerol, mixed substrates.

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

1. Пирог Т.П., Грищенко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С.15–24
2. Подгорский В.С., Иутицкая Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
3. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – 27, N 1. – P. 30–39.
4. Daverey A., Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2010. – 79, N 1. – P. 246–253.
5. Easterling E.R., French W.T., Hernandez R., Licha M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the grown and fatty composition of *Rhodotorula glutinis* // Biore. Technol. – 2009. – 100, N 1. – P. 356–361.
6. Freitas F., Alves V.D., Pais J., Carvalheira M., Costa N., Oliveira R., Reis M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol // Proc. Biochem. – 2010. – 45, N 3. – P. 297–305.
7. Kim Y.B., Yun H.S., Kim E.K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture // Biore. Technol. – 2010. – 100, N. 23 – P. 6028–6032.
8. Kivisto A., Santala V., Karp M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria // Biore. Technol. – 2010. – 101, N 22. – P. 8671–8677.
9. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 78, N 1. – P. 37–46.
10. Krause F.S., Henrich A., Blombach B., Kramer R., Eikmanns B.J., Seibold G.M. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use maltose, and its applications for the improvement of L-valine productivity // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – 76, N 1. – P. 370–374.
11. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma stamenis* CBS 9960 // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – 105, N 5. – P. 493–502.
12. Neto D.C., Meira J.A., de Araujo J.M., Mitchell D.A., Krieger N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 81, N 3. – P. 441–448.
13. Neto D.C., Bugay C., de Santana-Filho A.P., Joslin T., de Souza L.M., Sasaki G.L., Mitchell D.A., Krieger N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 89, N 5. – P. 1395–1403.
14. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // Appl. Biochem. Microbiol. – 2004. – 40, N 5. P. 470–475.
15. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – 45, N 3. P. 272–278.
16. Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T.T., Bourtoom T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plants to lipids and carotenoids // Proc. Biochem. – 2011. – 46, N 1. – P. 210–218.
17. Wisselink H.W., Toirkens M.J., Wu Q., Pronk J.T., van Maris A.J. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – 75, N 4. – P. 907–914
18. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – 18, N 3. – P. 213–219.
19. Zhao Z., Kuijvenhoven K., van Gulik W.M., Heijnen J.J., van Winden W.A., Verheijen P.J.T. Cytosolic NADPH balancing in *Penicillium chrysogenum* cultivated on mixtures of glucose and ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 89, N 1. – P. 63–72.

Отримано 04.02.2011