

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², О.Ю. Машенко¹,
С.А. Парфенюк¹, Г.А. Иутинская²

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

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

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА И НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Исследовали влияние дрожжевого автолизата и микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на различных углеродных субстратах (*n*-гексадекан, этанол, глицерин).

Показана возможность замены дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов в составе этанол- и *n*-гексадекансодержащих сред на сульфат меди (0,16 мкмоль/л) и сульфат железа (3,6 мкмоль/л), а в среде с глицерином – на 0,21 ммоль/л KCl, 38 мкмоль/л сульфата цинка и 0,16 мкмоль/л сульфата меди. В таких условиях культивирования штамма IMB B-7241 концентрация ПАВ в 1,2–1,6 раза превышала такую же на исходных средах, содержащих дрожжевой автолизат и микроэлементы.

Установлено активизирующее действие невысоких (0,01 мМ) концентраций Fe²⁺ на активность ферментов биосинтеза поверхностно-активных амино- (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа) и гликолипидов (фосфоенолпируват (ФЕП)-синтетаза, ФЕП-карбоксикиназа), а также анаплеротической реакции (ФЕП-карбоксилаза). Необходимость введения катионов цинка в глицеринсодержащую среду обусловлена их стимулирующим влиянием на активность 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилинзависимой алкогольдегидрогеназы – одного из ферментов катаболизма этого субстрата у *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, факторы роста, микроэлементы.

Ранее [2–4] при исследовании влияния условий культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) было установлено, что синтез ПАВ и биомассы повышался при наличии в среде с этанолом или глицерином дрожжевого автолизата и микроэлементов. В дальнейших исследованиях [6] была показана возможность интенсификации синтеза ПАВ при внесении в среду с этанолом (*n*-гексадеканом, жидкими парафинами) катионов меди. В работе [6] мы установили, что увеличение синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в присутствии Cu²⁺ обусловлено их активизирующим влиянием на активность алкангидроксилазы, а также 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин(НДМА)-зависимой алкогольдегидрогеназы и ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (фосфоенолпируватсинтетаза) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа).

Такие результаты позволили предположить, что именно Cu²⁺ является необходимым микроэлементом для синтеза ПАВ штаммом IMB B-7241 и, следовательно, нет необходимости во внесении в среду культивирования бактерий смеси микроэлементов и/или дрожжевого автолизата, которые могут быть заменены катионами меди.

В связи с изложенным выше цель работы – исследовать синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на различных субстратах в зависимости от наличия в среде культивирования некоторых микроэлементов и дрожжевого автолизата.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм *A. calcoaceticus* K-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером IMB B-7241.

A. calcoaceticus IMB B-7241 выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): (NH₂)₂CO – 0,35, NaCl – 1,0, Na₂HPO₄ · 12H₂O – 0,6, KH₂PO₄ – 0,14, MgSO₄ · 7H₂O – 0,1, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8–7,0. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему), содержащий (г/100 мл): ZnSO₄ · 7H₂O – 1,1; MnSO₄ · H₂O – 0,6; FeSO₄ · 7H₂O – 0,1; CuSO₄ · 5H₂O – 0,004; CoSO₄ · 7H₂O – 0,03; H₃BO₃ – 0,006; KI – 0,0001; ЭДТА (Трилон Б) – 0,5.

© Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.Ю. Машенко, С.А. Парфенюк, Г.А. Иутинская, 2013

В одном из вариантов в среду культивирования штамма IMB B-7241 вносили дрожжевой автолизат и раствор микроэлементов, не содержащий Cu^{2+} и Zn^{2+} , а также отдельно и в различных комбинациях дрожжевой автолизат, катионы меди, железа, цинка и калия. Cu^{2+} (0,16–0,80 мкмоль/л) добавляли в среду в виде раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 4 мг/100 мл (аналогично содержанию этой соли в растворе микроэлементов). Fe^{2+} (3,6 и 36 мкмоль/л) вносили в среду в виде 1 % раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Zn^{2+} (38 мкмоль/л) добавляли в среду в виде раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 1,1 г/100 мл (аналогично содержанию этой соли в растворе микроэлементов). K^+ в виде 1,6 % раствора KCl вносили в среду с глицерином в концентрации 0,21 ммоль/л, что соответствует его концентрации в составе дрожжевого автолизата [11].

В качестве источника углерода и энергии использовали этанол, *n*-гексадекан и глицерин в концентрации 1–2 % (по объему).

Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста, выращенная на среде указанного выше состава с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (36 мкмоль/л) без дрожжевого автолизата и микроэлементов. В качестве источника углерода и энергии при получении инокулята использовали этанол, *n*-гексадекан, глицерин в концентрации 0,5 % (по объему). 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 °C в течение 48–120 ч.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, концентрация ПАВ (г/л), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %) определяли, как описано ранее [2]. Получение бесклеточных экстрактов из клеток *A. calcoaceticus* IMB B-7241, выращенных на этаноле, *n*-гексадекане и глицерине, осуществляли, как описано в наших предыдущих работах [3–7].

Активность плутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49) и ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) анализировали согласно [1]. Активность пирролохинолинхинон- (ПХХ)-зависимой глицериндегидрогеназы (КФ 1.1.99.22) и НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) определяли как описано в нашей предыдущей работе [5]. При исследовании влияния катионов железа и цинка на активность ферментов в реакционную смесь вносили 0,01–0,1 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ соответственно.

Активность ферментов выражали в нмоль полученного за 1 мин продукта реакции в пересчете на 1 мг белка. Активность ферментов анализировали при 28–30 °C – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [2–4, 6]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. В табл. 1 представлены данные зависимости синтеза ПАВ на средах с этанолом, *n*-гексадеканом и глицерином, содержащих в различных комбинациях дрожжевой автолизат, микроэлементы, микроэлементы без Cu^{2+} , сульфат меди и сульфат железа (варианты сред 1–6). Базовой являлась среда 1, в которую дополнительно вносили дрожжевой автолизат и микроэлементы. Эта среда не содержала источника железа, поскольку $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ входит в состав микроэлементов (см. раздел «Материалы и методы»). Поскольку железо необходимо аэробным микроорганизмам для функционирования дыхательной цепи (синтеза АТФ) в среде, не содержащей микроэлементов (варианты 3–6), добавляли сульфат железа в концентрации 36 мкмоль/л [7].

Как видно из представленных в табл. 1 данных, при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на этаноле и *n*-гексадекане наиболее низкие показатели синтеза метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами наблюдались при отсутствии в среде Cu^{2+} (варианты 2, 5 и 6), причем дополнительное введение в такие среды дрожжевого автолизата не сопровождалось повышением синтеза ПАВ.

В то же время при выращивании штамма IMB B-7241 на средах, содержащих сульфат меди и железа (вариант 4) концентрация ПАВ была максимальной (2,7–3,0 г/л) и превышала в 1,4–1,6 раза таковую на базовых средах с этанолом и *n*-гексадеканом. Эти результаты свидетельствуют о том, что значимыми для образования ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на

этаноле и *n*-гексадекане являются катионы меди и железа. Отметим однако, что максимальный синтез метаболитов с эмульгирующими свойствами (E_{24} 90 %) отмечался при введении в этанолсодержащую среду, кроме сульфата меди и железа, еще и дрожжевого автолизата (вариант 3).

Иные, чем при культивировании штамма IMB В-7241 на этаноле и *n*-гексадекане, закономерности были установлены при росте бактерий на глицеринсодержащей среде. В этом случае максимальные показатели синтеза были отмечены на базовой среде 1 (см. табл. 1). Снижение концентрации ПАВ и индекса эмульгирования при отсутствии Cu^{2+} в среде (вариант 2, 5 и 6), наличии Cu^{2+} , но отсутствии других микроэлементов (вариант 3 и 4) могут свидетельствовать о потребности для образования метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами как катионов меди, так и других микроэлементов. В отличие от культивирования на этаноле и *n*-гексадекане, при выращивании на глицерине для повышения синтеза этих метаболитов необходимо введение в среду еще и дрожжевого автолизата.

Отметим, что при росте штамма IMB В-7241 на всех исследуемых субстратах (этанол, *n*-гексадекан, глицерин) концентрация биомассы была максимальной (0,9–1,1 г/л) на средах 1–3 (данные не представлены). Исключение из состава среды или дрожжевого автолизата, или микроэлементов или сульфата железа сопровождалось снижением уровня биомассы на 20–25 %.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при одновременном наличии дрожжевого автолизата и сульфата железа в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 с этанолом или глицерином (вариант 5) наблюдали снижение синтеза метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами по сравнению с показателями на базовой среде. Так как в дрожжевом автолизате содержатся катионы железа [11], вполне вероятно, что суммарное количество железа, вносимое в среду в виде дрожжевого автолизата и сульфата, ингибирует синтез ПАВ. Тем более, что в предыдущих исследованиях [3] нами было установлено ингибирующее действие катионов железа на активность ферментов биосинтеза ПАВ при выращивании штамма IMB В-7241 на глицерине. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что и при культивировании на этаноле, и *n*-гексадекане наблюдается похожая закономерность: в присутствии 0,1 мМ катионов железа активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы снижалась в 1,5–2 раза. Отметим, что ингибирование ФЕП-синтетазы, а также ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы имело место и при более низкой (0,05 мМ) концентрации Fe^{2+} . Вместе с тем при минимальной (0,01 мМ) из исследованных концентраций катионов железа наблюдали повышение активности некоторых ферментов биосинтеза ПАВ (табл. 2). В дальнейших исследованиях было установлено, что снижение в среде с этанолом и *n*-гексадеканом концентрации катионов железа в 10 раз (до 3,6 мкмоль/л) сопровождалось увеличением концентрации синтезированных ПАВ в 1,3–1,4 раза по сравнению с показателями на средах, содержащих 36 мкмоль/л $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Таблица 1

Влияние дрожжевого автолизата и микроэлементов на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на среде с этанолом, *n*-гексадеканом и глицерином

Вариант среды	Наличие в среде культивирования					ПАВ (г/л) при росте на			E_{24} (%) при росте на		
	дрожжевого автолизата	микроэлементов	микроэлементов без Cu^{2+}	сульфата меди	сульфата железа	этанол	<i>n</i> -гексадекан	глицерин	этанол	<i>n</i> -гексадекан	глицерин
1	+	+	–	–	–	1,7±0,08	2,2±0,11	1,5±0,07	75	58	78
2	+	–	+	–	–	1,3±0,06	1,8±0,09	0,95±0,05	65	50	68
3	+	–	–	+	+	1,6±0,08	2,2±0,11	1,0±0,05	90	57	65
4	–	–	–	+	+	2,7±0,13	3,0±0,15	0,8±0,04	75	70	60
5	+	–	–	–	+	1,3±0,06	1,8±0,09	0,7±0,03	60	52	50
6	–	–	–	–	+	1,4±0,07	1,9±0,09	0,6±0,03	60	51	43

Примечания. Состав микроэлементов указан в разделе «Материалы и методы». Концентрация сульфата меди и железа (мкмоль/л): 0,16 и 36 соответственно. При определении индекса эмульгирования культуральной жидкости погрешность не превышала 5 %. Концентрация субстратов в среде (% по объему): этанол и *n*-гексадекан – 2,0; глицерин – 1,0.

Поскольку независимо от природы ростового субстрата при наличии в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 катионов меди наблюдали увеличение синтеза ПАВ, на следующем этапе исследовали зависимость образования поверхностно-активных веществ от концентрации сульфата меди. Установлено, что повышение в 5 раз концентрации Cu^{2+} (с 0,16 до 0,80 мкмоль/л) в средах, содержащих сульфат железа и/или дрожжевой автолизат, приводило к снижению синтеза ПАВ на этаноле и глицерине, в то время как на *n*-гексадекане количество синтезируемых ПАВ практически не менялось либо увеличивалось незначительно. Отметим, что в диапазоне концентраций катионов меди 0,16–0,64 мкмоль/л показатели синтеза ПАВ на средах с сульфатом железа и/или дрожжевым автолизатом были практически одинаковыми. Синтез метаболитов с эмульгирующими свойствами на всех исследуемых субстратах не зависел от концентрации Cu^{2+} в среде культивирования штамма IMB B-7241.

Таблица 2

Влияние катионов железа на активность ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241

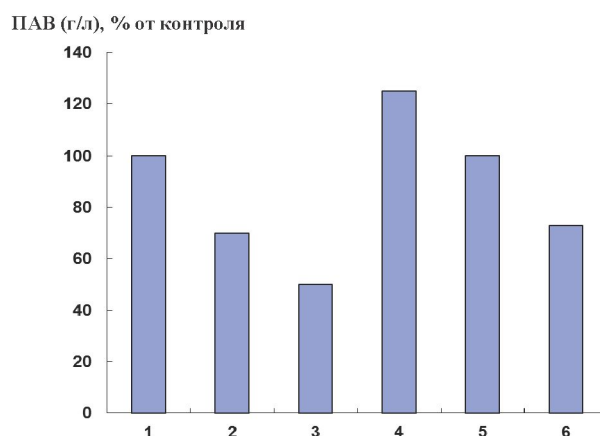
Источник углерода в среде культивирования	Концентрация $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в реакционной смеси, мМ	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)			
		НАДФ ⁺ -зависимая глутамат-дегидрогеназа	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксилаза	ФЕП-карбоксикиназа
Этанол	0	340±17	959±47	205±10	342±17
	0,01	680±34	890±44	274±13	411±20
	0,05	340±17	411±20	137±7	136±7
	0,10	168±8	274±13	Н.о.	Н.о.
<i>n</i> -Гексадекан	0	111±5	519±25	519±25	296±14
	0,01	148±7	370±18	222±11	444±22
	0,05	148±7	296±14	270±13	148±7
	0,10	74±3	Н.о.	222±11	Н.о.

Примечания. Концентрация субстратов в среде культивирования 1 %. Активность ферментов определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч). Н.о. – не определяли.

Так как при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на глицерине исключение из состава среды микроэлементов сопровождалось снижением синтеза ПАВ (см. табл. 1), на следующем этапе исследовали влияние одного из микроэлементов, в частности, Zn^{2+} , на образование поверхностно-активных веществ. Выбор Zn^{2+} был обусловлен такими причинами. Во-первых, содержание катионов цинка в смеси микроэлементов наиболее высокое (см. раздел «Материалы и методы»). Во-вторых, согласно данным литературы, НДМА-зависимая алкогольдегидрогеназа является Zn^{2+} -содержащим ферментом [17].

Эксперименты показали, что максимальный синтез ПАВ наблюдался при выращивании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде с глицерином, содержащей дрожжевой автолизат, сульфат меди и сульфат цинка (рисунок). Отметим, что исключение из состава среды как катионов цинка и меди, так и дрожжевого автолизата сопровождалось снижением синтеза ПАВ (рисунок).

Поэтому на следующем этапе исследовали влияние на образование ПАВ компонентов дрожжевого автолизата, содержащихся в его составе в максимальном количестве. Литературные данные [11] свидетельствуют, что основным минеральным компонентом дрожжевого автолизата является K^+ (3,3г/100 г автолизата). Дальнейшие исследования показали, что при замене дрожжевого автолизата в среде с глицерином, сульфатом меди и сульфатом цинка на эквивалентное по K^+ содержание KCl (0,21 ммоль/л) концентрация синтезированных ПАВ была такой же, как и на аналогичной среде с дрожжевым автолизатом (табл. 3).



Влияние Zn²⁺ и Cu²⁺ на синтез ПАВ при выращивании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на глицерине.

Среды дополнительно содержат: 1 – дрожжевой автолизат и микроэлементы; 2 – дрожжевой автолизат и микроэлементы без Zn²⁺; 3 – дрожжевой автолизат и микроэлементы без Zn²⁺ и Cu²⁺; 4 – дрожжевой автолизат, сульфат меди и сульфат цинка; 5 – дрожжевой автолизат, сульфат меди, сульфат железа и сульфат цинка; 6 – сульфат меди и сульфат цинка. 100 % (контроль) – концентрация ПАВ на среде 1. Концентрация сульфата меди, цинка и железа в средах (мкмоль/л): 0,16; 38 и 3,6 соответственно.

Таблица 3

Влияние катионов калия, меди и цинка на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на глицерине

Наличие в среде					ПАВ, г/л
дрожжевого автолизата	микро-элементов	KCl	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	CuSO ₄ ·5H ₂ O	
+	+	–	–	–	1,45±0,07
+	–	–	+	+	1,7±0,08
–	–	+	+	+	1,85±0,09
–	–	+	–	+	1,2±0,06
–	–	+	+	–	1,3±0,06

Примечание. Концентрация сульфата цинка и меди 38 и 0,16 мкмоль/л соответственно. Концентрация хлорида калия 0,21 ммоль/л, глицерина – 1,0 % (по объему).

В табл. 4 представлены данные по влиянию катионов цинка на активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы и ПХХ-зависимой глицериндегидрогеназы. В присутствии 0,1 mM Zn²⁺ наблюдали ингибирование активности НДМА-зависимого фермента в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, выращенных на этаноле и *n*-гексадекане. В то же время катионы цинка повышали активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы и снижали ПХХ-зависимую глицериндегидрогеназную активность в клетках бактерий, выращенных на глицерине.

Обсуждение. Из литературы известно, что факторы роста и ионы металлов (микроэлементы) необходимы для роста микроорганизмов и синтеза различных метаболитов, в том числе и ПАВ [7, 8, 10, 16, 19, 20–22], причем потребность в этих соединениях строго индивидуальна и должна устанавливаться экспериментально для каждого штамма-продуцента.

Так, дрожжевой экстракт является обязательным компонентом питательных сред, применяемых для культивирования некоторых продуцентов рамнолипидов: *Pseudomonas fluorescens* 29L [12], *Pseudomonas putida* [15], *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii* [9]. Максимальный синтез (более 18 г/л) рамнолипидов *Pseudomonas aeruginosa* AT10 наблюдался на среде, содержащей 50 г/л соевого масла, 4,6 г/л нитрата натрия и 7,4 мг/л катионов железа [16]. Дрожжи *Candida bombicola* (продуценты поверхностно-активных софоролипидов) выращивают на среде, содержащей дрожжевой экстракт, а также микроэлементы Zn²⁺ и Fe³⁺ [22].

Влияние катионов цинка на активность
алкогольдегидрогеназ *A. calcoaceticus* IMB В-7241

Источник углерода в среде культивирования	Концентрация $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в реакционной смеси, мМ	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
		НДМА-зависимая алкогольдегидрогеназа	ПХХ-зависимая глицериндегидрогеназа
Этанол	0	30±1,5	Н.о.
	0,01	30±1,5	Н.о.
	0,05	30±1,5	Н.о.
	0,10	12±0,6	Н.о.
<i>n</i> -гексадекан	0	39±1,9	Н.о.
	0,01	26±1,3	Н.о.
	0,05	9±0,45	Н.о.
	0,10	0	Н.о.
Глицерин	0	29±1,4	68±3,4
	0,01	59±2,9	55±2,7
	0,05	39±1,9	41±2,1
	0,10	29±1,4	41±2,1

Примечания. Концентрация субстратов в среде культивирования 1 %. Активность ферментов определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч). Н.о. – не определяли.

С помощью математических методов планирования эксперимента установлена концентрация катионов металлов, оптимальная для максимального синтеза ПАВ при культивировании *P. aeruginosa* S2 на глюкозе [10]. При концентрации 778 μM Mg^{2+} и 2,3 μM Fe^{2+} количество синтезируемых рамнолипидов достигало 2,3 г/л, что в 3,7 раза больше, чем на исходной среде до оптимизации.

Повышение в 10 раз количества синтезированного сурфактина наблюдали при увеличении концентрации ионов железа в среде культивирования *Bacillus subtilis* ATCC 21332 до 4 мМ [25]. Стимулирующее действие Fe^{3+} , а также Mn^{2+} , Mg^{2+} на синтез сурфактина отмечается и в других работах [19, 24, 26].

Чаще всего в качестве источника ростовых факторов исследователи используют дрожжевой автолизат или экстракт [7, 8, 21, 22]. Наши предыдущие эксперименты показали, что *Acinetobacter* sp. IMB В-7005 (продуцент микробного экзополисахарида этаполана) является ауксотрофом по пантотеновой кислоте и неидентифицированному фактору, содержащемуся в дрожжевом автолизате [7]. Отметим, что попытки идентифицировать этот фактор не увенчались успехом, хотя наши исследования позволили исключить из возможных факторов роста все аминокислоты и витамины (кроме пантотената), пурины и пиримидины. В этом случае использование дрожжевого автолизата в качестве источника ростовых факторов является оправданным. В других ситуациях конечно же целесообразнее (как с экономической, так и технологической точек зрения) вносить в среду культивирования индивидуальное вещество. Это касается как компонентов дрожжевого автолизата, так и смеси микроэлементов. Так, наши исследования, представленные в настоящей работе, показали, что дрожжевой автолизат и раствор микроэлементов можно исключить из состава среды культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241, заменив их катионами железа и меди (при росте на этаноле и *n*-гексадекане) или катионами меди, цинка и калия (при выращивании на глицерине).

В большинстве работ авторы не пытаются определить природу необходимых для продуцента ростовых факторов или конкретный микроэлемент. Очень часто, даже после идентификации необходимого для продуцента фактора роста или микроэлемента, остается неизвестной его физиологическая роль.

Отметим, однако, что в работах, посвященных оптимизации условий культивирования продуцентов сурфактина, авторы исследовали роль необходимых для биосинтетических процессов микроэлементов. Так, показано, что сайт Sfr белка, активирующего РСР домены сурфактинсинтазы, содержит Mg^{2+} [13, 14], Mn^{2+} стимулирует ассимиляцию азота и поглощение катионов калия [24], а также является (как и Fe^{3+}) кофактором ферментов биосинтетических путей [18] у различных штаммов *B. subtilis*.

Результаты наших исследований, представленные в данной работе, показывают, что потребность в тех или иных микроэлементах и/или факторах роста зависит от природы используемого источника углерода. Так, при культивировании на этаноле и *n*-гексадекане штамм ИМВ В-7241 нуждается в катионах меди и железа, а на глицерине – катионах меди и цинка. Собственно говоря, такая ситуация может иметь место в том случае, когда определенный фактор роста или чаще всего микроэлемент является активатором ферментов, принимающих участие в катаболизме того или иного ростового субстрата.

Так, в нашей предыдущей работе [6] мы приводили собственные и данные литературы об активации катионами меди алкангидроксилаз, в частности алкангидроксилазы АлкБ типа, функционирующей у многих микроорганизмов, растущих на *n*-алканах (в том числе, и у выделенного нами штамма *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017), и метанмонооксигеназ метанотрофных бактерий. Поскольку алкангидроксилаза АлкБ типа является железосодержащим ферментом, то повышение в *n*-гексадекансодержащей среде культивирования штамма ИМВ Ас-5017 катионов железа до 36 мкмоль/л сопровождалось интенсификацией роста и синтеза ПАВ [7]. Приведенные выше данные объясняют целесообразность введения вместо дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов в среду культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 с *n*-гексадеканом Cu^{2+} и Fe^{2+} , как и было показано в настоящей работе. Так как катионы меди являются активатором и НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы у штамма ИМВ В-7241, то логичным является замена в составе этанолсодержащей среды смеси микроэлементов на Cu^{2+} .

Введение цинка в глицеринсодержащую среду культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в качестве потенциально значимого микроэлемента, активирующего НДМА-зависимую алкогольдегидрогеназу, было подтверждено экспериментально. В то же время Zn^{2+} оказался ингибитором НДМА-зависимого фермента при выращивании бактерий на этаноле и *n*-гексадекане. Очевидно, у штамма ИМВ В-7241 имеется несколько НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ, окисляющих различные спирты. Отметим, что литературные данные относительно активаторов или ингибиторов НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы, функционирующей у микроорганизмов, весьма ограничены. Так, известно, что у *Amycolatopsis methanolica* этот фермент является цинк-содержащим [17], но в то же время при наличии в реакционной смеси 1 мМ Zn^{2+} его активность снижалась на 40 % [23].

Если микроэлементы являются активаторами ферментов биосинтеза целевого продукта, то потребность в них не должна строго зависеть от природы используемого источника углеродного питания. Катионы меди проявляли стимулирующее действие на активность ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- и аминоклиперидов у штамма ИМВ В-7241 [6], чем и объясняется потребность в этом микроэлементе при выращивании бактерий на всех исследуемых субстратах.

Таким образом, исследование потребности *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в дрожжевом автолизате и микроэлементах для синтеза ПАВ на различных углеродных субстратах позволило исключить из этанол- и гексадекансодержащей среды культивирования бактерий дрожжевой автолизат и смесь микроэлементов, заменив их сульфатом меди (0,16 мкмоль/л) и сульфатом железа (3,6 мкмоль/л), что упрощает и удешевляет процесс биосинтеза целевого продукта. Для синтеза ПАВ на глицерине значимыми являются катионы цинка (38 мкмоль/л) и меди (0,16 мкмоль/л); дрожжевой автолизат может быть заменен хлоридом калия (0,21 ммоль/л).

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², О.Ю. Мищенко¹, С.А. Парфенюк¹, Г.О. Лутиньська²

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ВПЛИВ ФАКТОРІВ РОСТУ І ДЕЯКИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241

Досліджували вплив дріжджового автолізату і мікроелементів на синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на різних вуглецевих субстратах (*n*-гексадекан, етанол, гліцерин).

Показано можливість заміни дріжджового автолізу та суміші мікроелементів у складі етанол- і *n*-гексадеканвмісних середовищ на сульфат міді (0,16 мкмоль/л) і сульфат заліза (3,6 мкмоль/л), а у середовищі з гліцерином – на 0,21 ммоль/л KCl, 38 мкмоль/л сульфату цинку і 0,16 мкмоль/л сульфату міді. За таких умов культивування штаму IMB B-7241 концентрація ПАР у 1,2–1,6 разів перевищувала цей показник на середовищах з дріжджовим автолизом і мікроелементами.

Встановлено активуючу дію невисоких (0,01 мМ) концентрацій Fe²⁺ на активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) і гліколіпідів (фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетаза, ФЕП-карбоксикиназа), а також анаплеротичної реакції (ФЕП-карбоксилаза). Необхідність введення катіонів цинку у гліцеринвмісне середовище зумовлене їх стимулюючим впливом на активність 4-нітросо-N,N-диметиланілін-залежної алкогольдегідрогенази – одного з ферментів катаболізму цього субстрату у *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, фактори росту, мікроелементи.

T.P. Pirog^{1,2}, *T.A. Shevchuk*², *O.Yu. Mashchenko*¹,
*S.A. Parfenyuk*¹, *G.A. Iutinskaya*²

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

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

EFFECT OF GROWTH FACTORS AND SOME MICROELEMENTS ON BIOSURFACTANT SYNTHESIS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241

Summary

The effect of yeast autolysate and microelements on synthesis of surface-active substances (SAS, biosurfactants) was investigated under cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on various carbon substrates (*n*-hexadecane, ethanol, glycerol). The authors have shown a possibility to substitute the yeast autolysate and microelement mixture in the composition of ethanol- and *n*-hexadecane-containing media by copper sulfate (0.16 μmol/l) and iron sulfate (3.6 μmol/l), and in the medium with glycerol by 0.21 mmol/l of KCl, 38 μmol/l of zinc sulfate and 0.16 μmol/l of copper sulfate. Under such conditions of cultivation of the strain IMV B-7241 the SAS concentration exceeded that on the initial media, which contained the yeast autolysate and microelements, 1.2-1.6 times. The authors have also established the activating effect of low (0.01 mM) concentrations of Fe²⁺ on activity of the enzymes of biosynthesis of surface-active amino- (NADP-dependent glutamate dehydrogenase) and glycolipids (phosphoenolpyruvate(PhEP)-synthetase, PhEP-carboxykinase), as well as of anaplerotic reaction(PhEP-carboxylase). A necessity to introduce zinc cations into glycerol-containing medium is determined by their stimulating effect on activity of 4-dinitroso-N,N-dimethylaniline-dependent alcohol dehydrogenase – one of the enzymes of this substrate catabolism in *A. calcoaceticus* IMV B-7241.

The paper is presented in Russian.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, інтенсифікація біосинтезу, біосурфактанти, фактор росту, мікроелементи.

Адреса авторів: *Pirog T.P.*, National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В., Коваленко М.О. Метаболізм С₂–С₆-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. B-7005 та B-7005 (ІНГ) // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №1. – С. 33–38.
2. Пирог Т.П., Антоноук С.І., 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.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 в среде с глицерином // Микробиол. журнал. – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Шулякова М.О. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у середовищі з гліцеролом // Біотехнологія. 2012. – Т.5, № 4, – С. 88–95.

5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Шулякова М.А. Метаболизм глицерина у продуцентов поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // Микробиол. журн. – 2012, – 74, № 4. – С. 29–36.
6. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Парфенюк С.А. Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В 7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // Там же. – 2013. – 75, № 1. – С. 3–13.
7. Подгорский В.С., Иутинская Г.А., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
8. Abdel-Mawgoud A.M., Lépine F., Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Appl. Microbiol, Biotechnol. – 2010. – 86, N 5. – P. 1323–1336.
9. Andrä J., Rademann J., Howe J., Koch M.H.J., Heine H., Zähringer U., Brandenburg K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization // Biol. Chem. – 2006. – 387, N 3. – P. 301–310.
10. Chen S., Lu W., Wei Y., Chen W.M., Chang J.S. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2 // Biotechnol. Prog. – 2007. – 23, N 3. – P. 661–666.
11. Edens N.K., Reaves L.A., Bergana M.S., Reyzer I.L., O'Mara P., Baxter J.H., Snowden M.K. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes *in vitro* // J. Nutr. – 2002. – 132, N 6. – P. 1141–1148.
12. Husain S. Effect of surfactants on pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 24, N 11. – 2411–2419.
13. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion // J. Bacteriol. – 2003. – 185, N 18. – P. 5627–5631.
14. Kinsinger R.F., Kearns D.B., Hale M., Fall R. Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis* // Ibid. – 2005. – 187, N 24. – P. 8462–8469.
15. Martinez-Toledo A., Rios-Leal E., Vazquez-Duhalt R., Gonzalez-Chavez Mdel C., Esparza-Garcia J.F., Rodriguez-Vazquez R. Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media // Environ. Technol. – 2006. – 27, N 2. – P. 137–142
16. Müller M.M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production // Appl. Microbiol, Biotechnol. – 2011. – 91, N 2. – P. 251–264.
17. Piersma S.R., Norin A., de Vries S., Jormvall, H., Duine J.A. Inhibition of nicotinoprotein (NAD⁺-containing) alcohol dehydrogenase by trans-4-(N,N-dimethylamino)-cinnamaldehyde binding to the active site // J. Protein Chem. – 2003. – 22, N 5. – P. 457–461.
18. Sen R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin // J. Chem. Tech. Biotechnol. – 1997. – 68, N 3. – P. 263–270.
19. Shaligram N.S., Singhal R.S. Surfactin – a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications // Food Technol. Biotechnol. – 2010. – 48, N 2. – P. 119–134.
20. Singh R.S., Singh H., Saini G.K. Response surface optimization of the critical medium components for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* FB-1 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – 152, N 1. – P. 42–53.
21. Vaidya B.K., Mutalik S.R., Joshi R.M., Nene S.N., Kulkarni B.D. Enhanced production of amidase from *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 by medium optimisation using a statistical experimental design // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 36, N 5. – P. 671–678.
22. van Bogaert I.N.A., Zhang J., Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids // Process Biochem. – 2011. – 46, N 4. – P. 821–833.
23. 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.
24. Wei Y.H., Chu I.M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Lett. – 2002. – 24, N 6. – P. 479–482.
25. Wei Y. H., Wang L.F., Chang J.S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Prog. – 2004. – 20, N 3. – P. 979–983.
26. Wei Y.H., Lai C.C., Chang J.S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 // Process Biochem. – 2007. – 42, N 1. – P. 40–45.

Отримано 27.11.2012