

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог^{1,2}, 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 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 аминоклидов (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 (рамонлипиды, софоролипиды, 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 природоохранных 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, 2012

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 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 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 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, 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [1–3, 5, 9–11]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе исследовали рост и синтез ПАВ при внесении в этанолсодержащую среду культивирования *R. erythropolis* IMB Ac-5017 Cu^{2+} в концентрации 0,1 и 0,5 мМ. Установлено, что в этом случае, независимо от концентрации катионов меди и момента их внесения (начало процесса, экспоненциальная или стационарная фаза роста) наблюдалось полное ингибирование роста бактерий и образования ПАВ. Поэтому в дальнейших исследованиях концентрацию Cu^{2+} снижали в 10 раз.

Данные по влиянию катионов меди в концентрации 0,01 и 0,05 мМ на синтез ПАВ при культивировании *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на различных углеродных субстратах представлены в табл. 1. Эти результаты показывают, что внесение Cu^{2+} в среду с этанолом в начале процесса культивирования штамма IMB Ac-5017 сопровождалось снижением в 3–4 раза уровня биомассы и в 1,7 раза концентрации ПАВ по сравнению с показателями на среде без катионов меди. В связи с этим в последующих экспериментах внесение Cu^{2+} осуществляли только в экспоненциальной и стационарной фазе роста бактерий.

Как следует из данных, представленных в табл. 1, при добавлении 0,01 мМ Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на среде с этанолом наблюдали увеличение условной концентрации ПАВ на 25 % по сравнению с культивированием штамма на среде без Cu^{2+} . При этом концентрация биомассы незначительно снижалась, а индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся. Внесение 0,01 мМ Cu^{2+} в стационарной фазе роста *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на среде с этанолом или повышение концентрации катионов меди до 0,05 мМ не сопровождалось каким-либо существенным изменением концентрации биомассы, показателя ПАВ* и E_{24} (табл. 1). После пересева бактерий, выращенных в присутствии Cu^{2+} , на среду без катионов меди наблюдали некоторое снижение показателей синтеза ПАВ по сравнению с использованием посевного материала, полученного на среде с этанолом без Cu^{2+} .

Таблица 1
Влияние Cu^{2+} на образование ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Субстрат	Момент внесения Cu^{2+} (фаза роста)	Концентрация Cu^{2+} , мМ	Биомасса, г/л	ПАВ*	E_{24} , %
Этанол	–	0	1,3±0,07	3,0±0,15	46±2,3
	Лаг-фаза	0,01	0,4±0,02	1,8±0,09	40±2,0
		0,05	0,3±0,02	1,8±0,09	40±2,0
	Экспоненциальная	0,01	1,0±0,05	3,8±0,19	47±2,4
		0,05	0,8±0,04	2,8±0,14	39±2,0
	Стационарная	0,01	1,2±0,06	2,8±0,14	45±2,3
0,05		1,1±0,06	2,9±0,15	41±2,1	
n-Гексадекан	–	0	0,7±0,04	4,0±0,20	55±2,8
	Экспоненциальная	0,01	0,7±0,04	4,0±0,20	52±2,6
		0,05	0,6±0,03	4,8±0,24	56±2,8
		0,1	0,6±0,03	5,6±0,28	60±3,0
		0,5	0,5±0,03	3,2±0,16	50±2,5
	Стационарная	0,01	0,8±0,04	3,8±0,19	54±2,7
		0,05	0,7±0,04	4,1±0,21	54±2,7
		0,1	0,7±0,04	5,0±0,25	57±2,9
		0,5	0,6±0,03	4,0±0,20	55±2,8
	Подсолнечное масло	–	0	0,7±0,04	4,8±0,24
Экспоненциальная		0,01	0,7±0,04	4,6±0,23	54±2,7
		0,05	0,6±0,03	6,0±0,30	60±3,0
		0,1	0,7±0,04	6,8±0,34	63±3,2
		0,5	0,4±0,02	2,7±0,14	42±2,1
Стационарная		0,01	0,7±0,04	4,5±0,23	55±2,8
		0,05	0,7±0,04	5,2±0,26	59±3,0
		0,1	0,7±0,04	4,4±0,22	47±2,4
		0,5	0,6±0,03	3,0±0,15	52±2,6

В то же время при культивировании штамма IMB Ac-5017 на *n*-гексадекане или подсолнечном масле наблюдали совсем другие закономерности, чем при выращивании на этаноле. Во-первых, клетки, растущие на гидрофобных субстратах, оказались устойчивыми к более высоким концентрациям катионов меди (табл. 1). Во-вторых, стимуляция синтеза ПАВ в присутствии катионов меди была более существенной, чем на этаноле. Так, внесение 0,1 мМ Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на среде с *n*-гексадеканом или подсолнечным маслом сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ на 40–42 % по сравнению с культивированием бактерий на средах без Cu^{2+} .

Независимо от момента внесения более высокой (0,5 мМ) концентрации Cu^{2+} в среду с подсолнечным маслом наблюдали снижение показателя ПАВ* в 1,6–1,7 раза по сравнению с таковым на среде без катионов меди (табл. 1). При культивировании штамма IMB Ac-5017 на среде с *n*-гексадеканом условная концентрация ПАВ снижалась всего в 1,2–1,3 раза при добавлении 0,5 мМ Cu^{2+} только в экспоненциальной фазе роста. Отметим, что при внесении катионов меди в среду с гидрофобными субстратами не отмечали существенных изменений концентрации биомассы и индекса эмульгирования культуральной жидкости по сравнению с показателями на среде без Cu^{2+} .

В табл. 2. представлены данные по влиянию катионов меди на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на этаноле, *n*-гексадекане и жидких парафинах.

Внесение максимальной из исследованных концентраций Cu^{2+} (0,5 мМ) в экспоненциальной фазе роста штамма IMB B-7241 на среде с этанолом, *n*-гексадеканом и жидкими парафинами сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ на 50–60 % по сравнению с показателем на среде без катионов меди (табл. 2). Добавление катионов меди как в экспоненциальной, так и стационарной фазе роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на всех исследуемых субстратах практически не сказывалось на значении индекса эмульгирования (E_{24}) и концентрации биомассы. Максимальное повышение (на 140 %) значения ПАВ* было зафиксировано при внесении 0,1 мМ Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста штамма IMB B-7241 на среде с жидкими парафинами (табл. 2). Отметим, что при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на этом субстрате существенное (в 2 и более раз) повышение условной концентрации ПАВ наблюдали во всех вариантах добавления катионов меди (независимо от их концентрации и момента внесения).

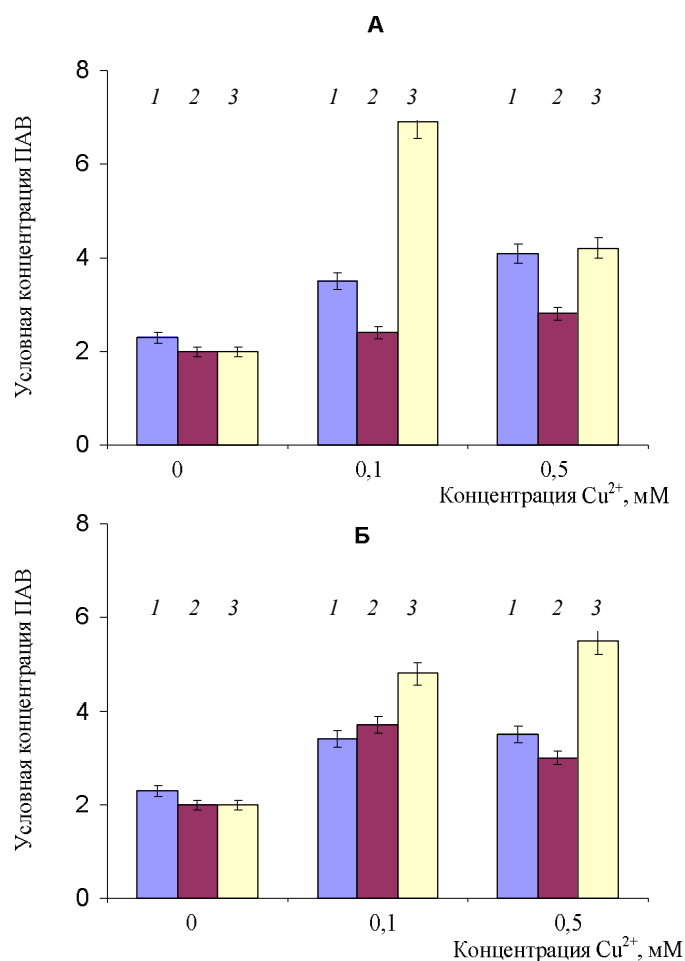
Интересным оказался тот факт, что пересев бактерий *A. calcoaceticus* IMB B-7241, выращенных на всех субстратах в присутствии Cu^{2+} , на среду без катионов меди сопровождался существенным повышением показателя ПАВ* по сравнению с использованием аналогичного инокулята, полученного на среде без Cu^{2+} (рисунок). При этом максимальное (в 2,1–3,5 раза) увеличение условной концентрации ПАВ было отмечено при культивировании штамма IMB B-7241 на жидких парафинах.

Данные, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют, что увеличение синтеза ПАВ в ответ на внесение катионов меди более значительное при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на средах с гидрофобными субстратами. Мы предположили, что положительное влияние Cu^{2+} на синтез ПАВ при выращивании бактерий на средах с углеводородами (*n*-гексадекан, жидкие парафины) может быть обусловлено активирующим действием катионов меди на активность монооксигеназ, катализирующих первую реакцию катаболизма этих субстратов. Ранее [5] нами было показано, что окисление *n*-гексадекана у штамма IMB Ac-5017 осуществляется трехкомпонентным алкангидроксилазным комплексом, состоящим из растворимой НАДН-рубредоксинредуктазы, растворимого рубредоксина и мембрансвязанной монооксигеназы, или алкангидроксилазы (АлкБ). Эксперименты показали, что этот фермент функционирует и у штамма *A. calcoaceticus* IMB B-7241, растущего на углеводородах.

Таблица 2

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в присутствии Cu^{2+}

Субстрат	Момент внесения Cu^{2+} (фаза роста)	Концентрация Cu^{2+} , мМ	Биомасса, г/л	ПАВ*	E_{24} %
Этанол	–	0	0,7±0,04	2,3±0,12	57±2,9
	Экспоненциальная	0,1	0,6±0,03	2,1±0,11	60±3,0
		0,5	0,5±0,03	3,7±0,19	65±3,3
		0,1	0,6±0,03	2,5±0,13	53±2,7
	Стационарная	0,5	0,6±0,03	2,6±0,13	50±2,5
–		0	0,9±0,05	2,0±0,10	53±2,7
<i>n</i> -Гексадекан	–	0	0,9±0,05	2,0±0,10	53±2,7
	Экспоненциальная	0,1	0,8±0,04	3,0±0,15	61±3,1
		0,5	0,8±0,04	3,2±0,16	58±2,9
		0,1	0,9±0,05	2,7±0,14	62±3,1
	Стационарная	0,5	1,0±0,05	2,9±0,15	63±3,2
–		0	0,6±0,03	2,0±0,10	57±2,9
Жидкие парафины	–	0	0,6±0,03	2,0±0,10	57±2,9
	Экспоненциальная	0,1	0,9±0,05	4,8±0,24	60±3,0
		0,5	0,9±0,05	4,1±0,21	59±3,0
		0,1	0,8±0,04	4,0±0,20	64±3,2
	Стационарная	0,5	0,8±0,04	4,3±0,22	63±3,2



Синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на этаноле (1), *n*-гексадекане (2) и жидких парафинах (3) в зависимости от концентрации Cu^{2+} в среде для получения инокулята.

Внесение Cu^{2+} в среду для получения инокулята: А – экспоненциальная фаза, Б – стационарная фаза.

Исследование активности алкангидроксилазы обоих штаммов в присутствии Cu^{2+} показало, что катионы меди являются активаторами этого фермента (табл. 3). Так, в присутствии 0,05 и 0,1 мМ Cu^{2+} активность алкангидроксилазы штамма IMB Ac-5017 повышалась в 1,5 и 2 раза соответственно. Более существенным было увеличение после внесения катионов меди активности алкангидроксилазы *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (табл. 3). Так, в присутствии 0,01 и 0,05 мМ Cu^{2+} алкангидроксилазная активность штамма IMB B-7241 повышалась в 3 раза. Отметим, что при концентрации катионов меди 0,01 мМ активность данного фермента у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 увеличивалась незначительно (с 769 до 870 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).

Поскольку увеличение синтеза ПАВ наблюдалось и при внесении Cu^{2+} в этанолсодержащую среду, мы предположили, что катионы меди могут также являться активаторами ключевых ферментов C_2 -метаболизма и биосинтеза ПАВ. Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют, что в присутствии определенных (разных для различных ферментов) концентраций Cu^{2+} в реакционной смеси наблюдается увеличение активности как 4-нитрозо-N,N-диметиланилин(НДМА)-зависимой алкогольдегидрогеназы, так и ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (ФЕП-синтетаза) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа) у бактерий *A. calcoaceticus* IMB B-7241, растущих на этаноле.

Таблица 3

**Влияние катионов меди на активность алкангидроксилаз
R. erythropolis IMB Ac-5017 и *A. calcoaceticus* IMB B-7241**

Концентрация Cu^{2+} в реакционной смеси, мМ	Активность алкангидроксилазы, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	
	IMB Ac-5017	IMB B-7241
0	769±38	1923±96
0,01	870±43	5769±288
0,05	1154±57	5769±288
0,10	1538±76	3846±192

Примечание. Активность алкангидроксилазы определяли в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (44–48 ч).

Таблица 4

Зависимость активности НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы и некоторых ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 от концентрации Cu^{2+}

Концентрация Cu^{2+} в реакционной смеси, мМ	Активность ферментов, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
	НДМА-алкоголь-дегидрогеназа	НАДФ ⁺ -глутамат-дегидрогеназа	ФЕП-синтетаза
0	48±2	676±33	5405±270
0,01	48±2	676±33	7838±390
0,05	71±3	810±40	5930±296
0,10	119±6	405±20	5946±297

Примечание. Активность ферментов определяли в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч).

Обсуждение. В последнее десятилетие в литературе появляется все больше сообщений о применении микробных ПАВ в природоохранных технологиях для удаления как тяжелых токсичных металлов, так и комплексных загрязнений, содержащих различные углеводороды и металлы [13–18, 20, 21, 23, 24, 26, 29]. В то же время нам не удалось обнаружить публикаций, в которых исследовался рост и образование ПАВ в присутствии тяжелых металлов, а концентрация металла и момент его внесения в среду культивирования рассматривались бы как факторы интенсификации синтеза микробных поверхностно-активных веществ.

В большинстве работ, посвященных роли микробных ПАВ в детоксикации токсичных металлов, исследуют сорбцию из растворов или почвы катионов металлов растворами очищенных ПАВ различной концентрации, причем наибольшее количество публикаций касается использования рамнолипидов. Так, в присутствии 50 мкмоль/мл рамнолипида наблюдали снижение концентрации цинка и хрома в растворе (10–50 мг/л) на 50 % в течение 24 ч [18]. Применение 1 %-ного раствора рамнолипида дало возможность извлечь из раствора 50 и 36 % Pb^{2+} и Cd^{2+} соответственно при начальной концентрации металлов 5 мг/л [17].

Благодаря взаимодействию микробных ПАВ с металлами они могут использоваться для извлечения металлов из руд, в частности, обедненных [13, 29]. Так, 0,1 % раствор рамнолипида с высокой эффективностью удалял из обедненной руды смесь мышьяка, свинца, меди, цинка при их концентрации в образцах (мг/кг) 2,18; 12,86; 1,1; 5,01 соответственно [29]. 25 мМ рамнолипида обеспечивали десорбцию из кварца 91,6 % Cd^{2+} и 87,2 % Zn^{2+} (при начальной концентрации 0,31 и 0,672 мкмоль/кг кварца соответственно) [13].

Способность к связыванию металлов установлена, кроме рамнолипидов, также для таких микробных ПАВ, как сурфактин (продуценты – различные штаммы *Bacillus subtilis*), а также софоролипиды (продуцент – *Torulopsis (Candida) bombicola*) [20, 21]. Исследования по использованию сурфактина для очистки загрязненной нефтью и металлами почвы показали, что промывка почвы, содержащей 890 мг/кг цинка, 420 мг/кг меди и 12,6 % нефти, 0,25 %-ным раствором сурфактина сопровождалась удалением 25 % меди та 6 % цинка. Софоролипиды вносили в почву, содержащую 13,4 % органических веществ, 110 мг/кг меди, 30 мг/кг цинка. Через 24 ч из почвы было удалено 38 % Cu^{2+} и 2% Zn^{2+} . Дополнительное внесение, кроме ПАВ, раствора соляной кислоты сопровождалось повышением удаления меди и цинка до 22 и 60 % соответственно [20, 21].

Установлено, что одним из механизмов детоксикации тяжелых металлов поверхностно-активными веществами является образование комплекса «ПАВ–металл», благодаря чему ПАВ способны защищать клетки продуцента и других микроорганизмов от действия металлов [13–18, 20, 21, 23, 24, 26, 29]. Наши предварительные эксперименты показали, что удаление ПАВ сопровождалось гибелью всех клеток *A. calcoaceticus* IMB В-7241 и *R. erythropolis* IMB Ас-5017 в присутствии Cu^{2+} (0,05–0,1 мМ), в то время как при наличии ПАВ в аналогичных условиях выживало до 60–70 % клеток.

Результаты, представленные в данной работе, показывают, что клетки штаммов IMB В-7241 и IMB Ас-5017 из экспоненциальной фазы роста более устойчивы к действию Cu^{2+} , чем из стационарной. Ранее [12] аналогичные данные были получены нами при исследовании защитных функций микробного экзополисахарида этаполана.

Известно, что в ответ на неблагоприятные факторы внешней среды у многих микроорганизмов наблюдается увеличение синтеза протекторных соединений (внеклеточных белков, полисахаридов) [12]. Вполне вероятно, что повышение синтеза ПАВ у штаммов IMB В-7241 и IMB Ас-5017 в присутствии катионов меди обусловлено функционированием подобного адаптационного механизма. Ранее [12] нами был разработан двухстадийный способ получения микробного полисахарида этаполана, на первой стадии которого продуцент выращивали в оптимальных для роста и синтеза этаполана условиях, а на второй – создавали неблагоприятные условия (внесение биоцидов, повышение температуры), что сопровождалось усилением синтеза полисахарида и улучшением его реологических характеристик.

Другим механизмом, обуславливающим повышение синтеза ПАВ штаммами IMB В-7241 и IMB Ас-5017 в присутствии Cu^{2+} , является активация катионами меди некоторых ферментов, в частности алкангидроксилазы АлкБ типа (см. табл. 3). Из литературы известно [25, 27], что Cu^{2+} выполняет ключевую роль в физиологии и активности метанотрофов. Окисление метана у метанотрофов осуществляется мем-

брансвязанной и/или растворимой метаноксигеназой, принадлежащей к классу алкангидроксилаз, как и ферменты катаболизма *n*-алканов. У метанотрофов, имеющих обе метаноксигеназы, Cu^{2+} является ключевым фактором как в регуляции экспрессии генов, ответственных за их синтез, так и регуляции активности этих ферментов. Для многих метанотрофов установлена зависимость показателей роста (скорость роста, концентрация биомассы, экономический коэффициент) от содержания катионов меди в среде культивирования [25]. В последние годы показано, что метанотрофы способны «депонировать» катионы меди, необходимые для функционирования метаноксигеназы, благодаря синтезу внеклеточного белка метанобактина, который рассматривается как аналог железо-сидерофоров у других бактерий [25].

В работе [22] рассматриваются механизмы устойчивости к меди у бактерий и архей. Так, у грамотрицательных бактерий такая резистентность обусловлена выбросом (эффлюкс) металла из цитоплазмы в периплазму, осуществляемым АТФазой, локализованной в мембране. Некоторые микроорганизмы способны «выкачивать» Cu из цитоплазмы во внеклеточное пространство с помощью системы RND (resistance nodulation cell division) носителя, а также могут связывать медь в периплазме при участии так называемых Cu -белков. Перечисленные системы детоксикации характерны для нейтрофилов, устойчивых к относительно низким концентрациям меди (3–8 мМ). В то же время в определенных экосистемах (горные выработки, кислые рудники) обнаружены бактерии и археи, резистентные к концентрациям меди до 200–800 мМ [22]. Такая сверхустойчивость обусловлена одновременным использованием всех (или большинства) таких элементов: большое количество детерминант устойчивости, дублирование некоторых из таких Cu -детерминант, функционирование новых Cu -шаперонов, полифосфатная система, система оксидативного стресса.

В работе [3] нами было показано, что синтез ПАВ у *A. calcoaceticus* IMB В-7241, растущего на этаноле, увеличивается при внесении в среду раствора микроэлементов. Поскольку в состав микроэлементов входит медь, не исключено, что именно наличие Cu^{2+} и явилось фактором, обуславливающим усиление синтеза ПАВ у данных бактерий. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Как показали исследования, представленные в данной работе, в присутствии определенных концентраций катионов меди повышается активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы, ФЕП-синтазы и глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (см. табл. 4). В то же время из литературы известно, что 1 мМ CuSO_4 на 90 % ингибирует активность НДМА-алкогольдегидрогеназы у *Amycolatopsis methanolica* [28], а также катионы меди являются ингибитором НАД⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *Streptomyces fradiae* [19]. Отметим, что нам не удалось обнаружить в литературе сведений о каком-либо влиянии Cu^{2+} на активность ФЕП-синтазы у микроорганизмов. Следовательно, наши результаты являются одними из первых, свидетельствующих об активации НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы, ФЕП-синтазы и НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы катионами меди.

Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность интенсификации синтеза ПАВ *R. erythropolis* IMB Ас-5017 и *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на гидрофобных (*n*-гексадекан, жидкие парафины, подсолнечное масло) и гидрофильных (этанол) субстратах при внесении катионов меди в экспоненциальной фазе роста обоих штаммов или использовании посевного материала *A. calcoaceticus* IMB В-7241, выращенного до стационарной фазы роста на среде с Cu^{2+} .

Представленные в данной работе результаты дополняют наши предыдущие данные [12] о повышении эффективности технологий микробного синтеза путем увеличения в среде культивирования продуцента активаторов ключевых ферментов метаболизма ростового субстрата и биосинтеза целевого продукта.

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-нітрозо-*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

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

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

**EFFECT OF Cu^{2+} ON SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS *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 *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* ЕК-1 на n-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* ЕК-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 n-гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – **47**, № 4. – С. 436–442.
9. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Нутинская 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., Билец И.В. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на смеси n-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 гліцерині // 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. Asei 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.N., 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