

Т.П. Пирог^{1,2}, И.В. Савенко¹, Т.А. Шевчук²

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

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

ВЛИЯНИЕ Zn^{2+} НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 С АНТИМИКРОБНЫМИ И АНТИАДГЕЗИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Цель. Исследовать влияние катионов цинка в составе этанол- и *n*-гексадекансодержащих сред на антиадгезивную и антимикробную активность поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. **Методы.** ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Количество адгезированных клеток определяли спектрофотометрическим методом, антимикробные свойства ПАВ – по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК). **Результаты.** Внесение Zn^{2+} (38 мкмоль/л) в среду с этанолом и *n*-гексадеканом, содержащую сульфат меди и сульфат железа, сопровождалось образованием ПАВ с более высокой антимикробной и антиадгезивной активностью, а также увеличением активности НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента биосинтеза аминокислот. Минимальная ингибирующая концентрация по отношению к *Escherichia coli* IEM-1, *Enterobacter cloacae* C-8, *Staphylococcus aureus* БМС-1 и *Proteus vulgaris* ПА-12 поверхностно-активных веществ, синтезируемых в присутствии Zn^{2+} , и адгезия *E. coli* IEM-1 на абиотических поверхностях, обработанных такими ПАВ, были соответственно в 1,6–3,3 раза и на 10–19 % ниже, чем аналогичные показатели для препаратов, полученных при культивировании штамма IMB B-7241 в среде без катионов цинка. Активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы в конце экспоненциальной фазы роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в среде с этанолом (*n*-гексадеканом), сульфатом меди, железа и цинка составляла 1739 ± 87 (8333 ± 416) нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что в 2 и 15 раз выше, чем в аналогичных условиях культивирования на этаноле и *n*-гексадекане без Zn^{2+} . **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о возможности регуляции биосинтеза поверхностно-активных веществ с антимикробными и антиадгезивными свойствами у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 при внесении в среду с этанолом (*n*-гексадеканом) катионов цинка – активатора НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента синтеза аминокислот, а также о возможности регуляции биологических свойств поверхностно-активных веществ в процессе культивирования продуцента.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, катионы цинка, активность глутаматдегидрогеназы, антиадгезивная и антимикробная активность.

В наших предыдущих исследованиях была установлена зависимость антиадгезивных и антимикробных свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ) от наличия в среде культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 факторов роста и определенных микроэлементов, а также природы источника углеродного питания [1, 2]. Замена дрожжевого автолизата и

смеси микроэлементов в составе этанол- и *n*-гексадекансодержащих сред на сульфат меди и сульфат железа, а в среде с глицерином – на хлорид калия, сульфат цинка и сульфат меди сопровождалась повышением синтеза ПАВ [3], но при этом снижением их антиадгезивной и антимикробной активности [1, 2]. Полученные данные свидетельствуют о том, что не всегда повышение синтеза ПАВ сопровождается образованием целевого продукта с необходимыми биологическими свойствами, а также о необходимости исследований по зависимости свойств поверхностно-активных веществ от условий культивирования продуцента.

В работе [2] мы предположили, что различные биологические свойства ПАВ, синтезируемых *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде с факторами роста и без них могут быть обусловлены изменением в составе поверхностно-активных веществ соотношения глико-, amino- и нейтральных липидов. Согласно литературным данным [4, 5], аминолипиды являются более эффективными антимикробными агентами, чем гликолипиды. Таким образом, вполне вероятно, что при наличии в этанол- или *n*-гексадекансодержащей среде культивирования штамма IMB В-7241 дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов, содержание аминолипидов в составе синтезированного комплекса ПАВ выше, чем у полученного на среде с сульфатом меди и сульфатом железа. Кроме того, не исключено, что в составе микроэлементов – компонентов среды для культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 содержатся катионы, являющиеся активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента биосинтеза аминолипидов у данного штамма [3]. Повышение в присутствии катионов цинка активности этого фермента в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, выращенных на этаноле и *n*-гексадекане [2], позволило предположить, что внесение Zn²⁺ в среду с сульфатом меди и сульфатом железа будет сопровождаться усилением синтеза поверхностно-активных аминолипидов, а также, следовательно, повышением антимикробной и антиадгезивной активности синтезированных ПАВ.

В связи с изложенным выше, цель данной работы – исследовать влияние катионов цинка в составе этанол- и *n*-гексадекансодержащих сред культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы, а также на антимикробную и антиадгезивную активность синтезируемых ПАВ.

Материалы и методы. Объектом исследований являлся штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номером IMB В-7241.

Штамм *A. calcoaceticus* IMB В-7241 выращивали в 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.

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

В одном из вариантов в среду с этанолом и гексадеканом вместо дрожжевого автолизата и раствора микроэлементов вносили Cu^{2+} (0,16 мкмоль/л) в виде раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 4 мг/100 мл и Fe^{2+} (3,6 мкмоль/л) в виде 1 % раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, а также Zn^{2+} (38 мкмоль/л) в виде раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 1,1 г/100 мл.

Посевной материал – культура в середине экспоненциальной фазы роста, выращенная в среде указанного выше состава с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ без дрожжевого автолизата и микроэлементов. В качестве источника углерода и энергии при получении инокулята использовали этанол и *n*-гексадекан 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 °С в течение 24–120 ч.

Из супернатанта культуральной жидкости, содержащего ПАВ (**препарат 1**), экстракцией смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 (смесь Фолча) выделяли ПАВ (**препарат 2**), как описано в нашей работе [6].

Концентрацию ПАВ в препаратах 1 и 2 устанавливали весовым методом после экстракции смесью Фолча.

В качестве тест-культур при определении антимикробных и антиадгезивных свойств ПАВ использовали штаммы бактерий (*Escherichia coli* IEM-1, *Enterobacter cloacae* C-8, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Proteus vulgaris* ПА-12) из коллекции живых культур кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий.

Исследование антиадгезивных свойств осуществляли, как описано ранее [6]. Количество адгезированных клеток определяли спектрофотометрическим методом как отношение оптической плотности суспензии, полученной из обработанных препаратами ПАВ (супернатант, раствор ПАВ) материалов (линолеум (поливинилхлорид), кафель, нержавеющая сталь, пластик) к оптической плотности контрольных (без обработки ПАВ) образцов, и выражали в процентах.

Антимикробные свойства поверхностно-активных веществ (препарат 2) анализировали по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Определение МИК осуществляли методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ), как описано нами ранее [7]. Результаты оценивали визуально по помутнению среды: (+) – пробирки, в которых наблюдали помутнение среды (рост тест-культуры), (–) – помутнения не было (отсутствие роста). Минимальную ингибирующую концентрацию ПАВ определяли как среднее значение концентраций ПАВ в последней пробирке, в которой рост отсутствовал и в следующей, в которой рост наблюдался.

Получение бесклеточных экстрактов и определение активности фермента осуществляли, как описано ранее [2]. Активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4) анализировали по образованию глутамата при окислении НАДФН при 340 нм.

Все опыты проводили в 3-х повторностях; количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [6].

Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На первом этапе анализировали активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на этаноле и *n*-гексадекане в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов, а также сульфата меди, железа и цинка (табл. 1).

Эксперименты показали, что внесение в среду культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 с этанолом дополнительно к сульфату меди и железа еще и сульфата цинка сопровождалось повышением ак-

Таблица 1

**Влияние катионов цинка в среде культивирования
A. calcoaceticus IMB В-7241 на активность НАДФ⁺-зависимой
глутаматдегидрогеназы**

Факторы роста и микроэлементы в среде культивирования	Фаза роста	Активность (нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка) при культивировании на	
		этанол	<i>n</i> -гексадекане
Дрожжевой автолизат + микроэлементы	начало экспоненциальной	1967±98	Н.о.
	конец экспоненциальной	1739±87	1111±55
Сульфат меди, сульфат железа	начало экспоненциальной	1017±51	Н.о.
	конец экспоненциальной	870±43	556±27
Сульфат меди, сульфат железа, сульфат цинка	начало экспоненциальной	2373±118	Н.о.
	конец экспоненциальной	1739±87	8333±416

Примечание: Н.о. – не определяли

тивности НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы до уровня таковой при выращивании бактерий в среде с дрожжевым автолизатом и микроэлементами (1739–2373 и 1739–1967 нмоль мин⁻¹мг⁻¹ белка соответственно). Более существенным было увеличение активности ключевого фермента биосинтеза поверхностно-активных аминоклипоидов при дополнительном внесении сульфата цинка в среду с *n*-гексадеканом. В таких условиях культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназная активность была почти в 8 раз выше по сравнению с культивированием на *n*-гексадекане в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов (1111 и 8333 нмоль мин⁻¹мг⁻¹ белка соответственно).

Такие результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения об усилении синтеза аминоклипоидов при добавлении в среду с этанолом (*n*-гексадеканом) катионов цинка (дополнительно к Fe²⁺ и Cu²⁺).

Отметим, что данные литературы, касающиеся влияния катионов металлов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у микроорганизмов, немногочисленны.

Так, у архей *Thermococcus* sp. активность этого фермента повышалась на 135, 104 и 250 % в присутствии 5 мМ CaCl₂, MgCl₂ и MnCl₂ соответственно [8]. Позже [9] было установлено, что катионы кальция и магния также являются активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы и у архей *Thermococcus waiotapuensis*: при наличии 10 мМ CaCl₂ и 10 мМ MgSO₄ наблюдали увеличение активности в 1,3 раза по сравнению с таковой без катионов металлов. У аэробных гипертермофильных архей *Aeropyrum pernix* K1 активаторами ферментами являются катионы калия и натрия в концентрации 50–200 мМ [10].

Данные о влиянии катионов цинка на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у микроорганизмов появились в 1980 г. [11], однако до настоящего времени в литературе имеются лишь отдельные такие сообщения. В работе [11] отмечается, что, в зависимости от концентрации, Zn²⁺ может быть либо активатором, либо ингибитором этого фермента: при концентрации менее 0,1 мМ активность глутаматдегидрогеназы *Mycobacterium smegmatis* повышается, а при концентрации катионов цинка выше 0,1 мМ наблюдается ингибирование активности фермента. В присутствии 1 мМ Zn²⁺ наблюдали ингибирование на 40 % активности НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы *Escherichia coli* [12], а при концентрации 5 мМ ZnCl₂ – снижение активности этого фермента у *Aspergillus terreus* [13].

Таким образом, наши результаты являются одними из первых, в которых сообщается об активации НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы микроорганизмов катионами цинка.

На следующем этапе анализировали антимикробные и антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ, полученных при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде с этанолом (*n*-гексадеканом), содержащей дрожжевой автолизат и микроэлементы, сульфат меди и сульфат железа, а также сульфат меди, сульфат железа и сульфат цинка (табл. 2–4).

Данные, представленные в табл. 2, подтвердили наше предположение о возможности усиления антимикробной активности синтезируемых на этаноле и *n*-гексадекане ПАВ при дополнительном внесении сульфата цинка в среду с CuSO₄ и FeSO₄. Так, минимальная ингибирующая концентрация по отношению ко всем исследуемым тест-культурам ПАВ, образуемым в присутствии Zn²⁺, была в 1,6–3,3 раза ниже, чем МИК поверхностно-активных веществ, полученных при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде, содержащей сульфат меди и сульфат железа. Отметим, что ПАВ, синтезируемые в присутствии катионов цинка, в большинстве случаев оказались более эффективными антимикробными агентами по сравнению с поверхностно-активными веществами, образуемыми в среде с дрожжевым автолизатом и микроэлементами (например, МИК по отношению к *E. coli* IEM-1 составляла 11–14 и 22–27 мкг/мл соответственно, табл. 2). Наблюдаемое явление можно объяснить наличием в составе дрожжевого автолизата потенциальных ингибиторов НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у штамма IMB В-7241, поскольку ранее [5] было показано, что катионы марганца и кобальта, содержащиеся (кроме катионов меди, железа и цинка) в смеси микроэлементов, не влияют на активность этого фермента.

Таблица 2

Минимальная ингибирующая концентрация ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241, синтезированных в среде с этанолом и *n*-гексадеканом

Субстрат	Наличие в среде	МИК, мкг/мл			
		<i>E. coli</i> IEM-1	<i>E. cloacae</i> С-8	<i>S. aureus</i> БМС-1	<i>P. vulgaris</i> ПА-12
Этанол	дрожжевого автолизата и микроэлементов	22	45	6	11
	CuSO ₄ , FeSO ₄	45	90	11	22
	ZnSO ₄ , CuSO ₄ , FeSO ₄	14	28	7	14
<i>n</i> -Гексадекан	дрожжевого автолизата и микроэлементов	27	>108	11	54
	CuSO ₄ , FeSO ₄	36	>144	18	72
	ZnSO ₄ , CuSO ₄ , FeSO ₄	11	88	6	44

Примечание: При определении МИК погрешность не превышала 5 %

Таблица 3

Влияние ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241, синтезированных в среде с этанолом, на прикрепление *E. coli* IEM-1 к абиотическим поверхностям

Наличие в среде культивирования	Препарат	Материалы, % адгезии			
		пластик	линолеум	кафель	сталь
дрожжевого автолизата и микроэлементов	1 супернатант	38	30	33	38
	2 раствор ПАВ	31	22	29	29
CuSO ₄ , FeSO ₄	1 супернатант	50	42	49	53
	2 раствор ПАВ	46	44	42	48
ZnSO ₄ , CuSO ₄ , FeSO ₄	1 супернатант	36	29	35	34
	2 раствор ПАВ	30	26	30	32

Примечания: Табл. 3 и 4: концентрация ПАВ в препаратах 1 (супернатант) и 2 (раствор ПАВ) составляла 5 мкг/мл. При определении адгезии погрешность не превышала 5 %

Адгезия микроорганизмов на абиотических поверхностях после обработки поверхностно-активными веществами, синтезированными в среде с этанолом, сульфатом меди, железа и цинка, была на 12–19 % ниже, чем таковая на материалах, обработанных препаратами, полученными при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде, содержащей

Таблица 4

Адгезия *E. coli* IEM-1 на абиотических поверхностях после обработки ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезированных в среде с *n*-гексадеканом

Наличие в среде культивирования	Препарат	Материалы, % адгезии			
		пластик	линолеум	кафель	сталь
дрожжевого автолизата и микроэлементов	1 супернатант	42	41	47	44
	2 раствор ПАВ	46	43	52	51
CuSO ₄ , FeSO ₄	1 супернатант	52	52	59	56
	2 раствор ПАВ	54	56	64	61
ZnSO ₄ , CuSO ₄ , FeSO ₄	1 супернатант	40	40	45	45
	2 раствор ПАВ	44	42	49	50

сульфат меди и сульфат железа (табл. 3). Аналогичные результаты были получены и при исследовании антиадгезивных свойств поверхностно-активных веществ, синтезированных в среде с *n*-гексадеканом: наличие катионов цинка в среде сопровождалось образованием ПАВ, являющихся более эффективными антиадгезивными агентами по сравнению с препаратами, полученными при выращивании штамма IMB B-7241 в аналогичной среде без Zn²⁺ (табл. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регуляции биологических свойств ПАВ в процессе культивирования продуцента на модифицированной среде, содержащей активаторы ферментов, ответственных за синтез компонентов комплекса поверхностно-активных веществ с необходимыми определенными свойствами.

Отметим, что в доступной литературе нам не удалось обнаружить подобных сведений. Встречаются отдельные работы, в которых установлена зависимость антимикробных свойств ПАВ от условий культивирования продуцента, например, от природы источника углерода [14]. Однако в работе [14] авторы только констатировали факт влияния природы источника углеродного питания на проявление антифунгальных свойств синтезируемых ПАВ, не объясняя и не изучая механизмов, лежащих в основе этого явления.

В другой работе [15] исследовали биологические свойства липопептидов *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Установлено, что только две фракции комплекса из шести (бацитрацин Д и фенгицин) проявляли антифунгальное действие на *Fusarium oxysporum*, причем бацитрацин оказался более сильным антимикробным агентом. Исследователи получили генно-инженерные штаммы SQR9M1 и SQR9M2, синтезирующие только фенгицин и бацитрацин. Липопептид штамма SQR9M1 не проявлял антифунгального действия. Добавление очищенного бацитрацина к фенгицину сопровождалось возобновлением антифунгального эффекта.

Эти результаты свидетельствуют о возможности регуляции свойств микробных липопептидов с использованием генно-инженерных штаммов, синтезирующих только определенные составляющие комплекса ПАВ.

Другие авторы отмечают, что получение микробных ПАВ (в частности, липопептидов) с заданными биологическими свойствами возможно в результате постферментационной химической модификации целевого продукта [16].

Наши результаты, представленные в данной работе, свидетельствуют о том, что существует более простой путь получения микробных ПАВ с определенными свойствами, базирующийся на выявлении возможных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов конструктивного метаболизма с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды. Ранее такой подход был использован нами для интенсификации синтеза микробных ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [17] и *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 [18].

В работе [19] авторы также установили возможность повышения синтеза сурфактина при увеличении содержания Mn^{2+} до 0,1 мМ в среде культивирования *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Стимулирующее действие катионов марганца состоит в том, что они являются активаторами ферментов как первичного (нитратредуктаза), так и вторичного (глутаматсинтаза) метаболизма, обеспечивающих биосинтез аминокислот – предшественников сурфактина.

Данные настоящей статьи показывают, что такой прием оказывается достаточно эффективным не только для повышения синтеза микробных ПАВ, но и для регуляции их биологических свойств.

Так, в результате проведенной работы установлено, что внесение в среду с этанолом (*n*-гексадеканом) Zn^{2+} – активатора НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы – ключевого фермента синтеза аминокислот у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 сопровождается усилением антимикробной и антиадгезивной активности синтезируемых поверхностно-активных веществ.

Отметим, что необходимость получения микробных ПАВ с заданными свойствами обусловлена тем, что в зависимости от области практического использования препаратов (природоохранные технологии, сельское хозяйство, медицина и др.) их биологические свойства должны быть различными. Так, например, для деструкции нефтяных загрязнений в воде и почве целесообразно применять поверхностно-активные вещества, обладающие высокой антимикробной активностью. Это обусловлено тем, что основным механизмом интенсификации нефти в присутствии ПАВ является сольubilизация углеводородов нефти, и, как следствие, активация природной нефтеокисляющей микробиоты, на которую те же ПАВ могут оказывать и антимикробное действие [20]. Эффективные антимикробные и антиадгезивные свойства микробных ПАВ полезны при использовании их, например, в составе дезинфицирующих и моющих средств [16].

Полученные нами данные согласуются с предыдущими [1, 2] и свидетельствуют о необходимости исследований по зависимости свойств поверхностно-активных веществ от условий культивирования продуцента.

Т.П. Пирог^{1,2}, І.В. Савенко¹, Т.А. Шевчук²

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

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ВПЛИВ Zn^{2+} НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 З АНТИМІКРОБНИМИ ТА АНТИАДГЕЗИВНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Резюме

Мета. Дослідити вплив катіонів цинку в складі етанол і *n*-гексадеканвмісних середовищ на антиадгезивну та антимікробну активність поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241. **Методи.** ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Кількість адгезованих клітин визначали спектрофотометричним методом, антимікробні властивості ПАР – за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). **Результати.** Внесення Zn^{2+} (38 мкмоль/л) у середовище з етанолом і *n*-гексадеканом, що містить сульфат міді та заліза, супроводжувалося утворенням ПАР з вищою антимікробною та антиадгезивною активністю, а також збільшенням активності НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів. Мінімальна інгібуюча концентрація щодо *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Enterobacter cloacae* С-8, *Staphylococcus aureus* БМС-1 і *Proteus vulgaris* ПА-12 поверхнево-активних речовин, синтезованих за присутності Zn^{2+} , і адгезія *E. coli* ІЕМ-1 на абіотичних поверхнях, оброблених такими ПАР, були, відповідно, у 1,6–3,3 рази і на 10–19 % нижчими, ніж аналогічні показники для препаратів, отриманих за умов росту штаму ІМВ В-7241 в середовищі без катіонів цинку. Активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази наприкінці експоненційної фази росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з етанолом (*n*-гексадеканом), сульфатом міді, заліза і цинку становила 1739 ± 87 (8333 ± 416) нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, що у 2 і 15 разів вище, ніж в аналогічних умовах культивування на етанолі і *n*-гексадекані без Zn^{2+} . **Висновки.** Отримані дані засвідчують можливість регуляції біосинтезу поверхнево-активних речовин з антимікробними та антиадгезивними властивостями у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за внесення в середовище з етанолом (*n*-гексадеканом) катіонів цинку – активатора НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту синтезу аміноліпідів, а також можливість регуляції біологічних властивостей поверхнево-активних речовин у процесі культивування продуцента.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, поверхнево-активні речовини, катіони цинку, активність глутаматдегідрогенази, антиадгезивна і антимікробна активність.

T.P. Pirog^{1,2}, I.V. Savenko¹, T.A. Shevchuk²

¹ National University of Food Technologies,
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

EFFECT OF Zn^{2+} ON SYNTHESIS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 SURFACTANTS WITH ANTIMICROBIAL AND ANTIADHESIVE PROPERTIES

Summary

Aim. To study the effect of zinc cations in the composition of ethanol and *n*-hexadecane containing medium on the antiadhesive and antimicrobial activity of *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 surfactants. **Methods.** Surfactants were extracted from

supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2:1). The number of attached cells was determined spectrophotometrically, antimicrobial properties – by index of the minimum inhibitory concentration (MIC). **Results.** Adding Zn^{2+} (38 mmol/l) into medium with ethanol and n-hexadecane containing copper sulphate and iron sulphate, was accompanied by the formation of surfactant with higher antimicrobial and antiadhesive activity, as well as increasing activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase – a key enzyme of aminolipids biosynthesis. The minimum inhibitory concentration against *Escherichia coli* IEM-1, *Enterobacter cloacae* C-8, *Staphylococcus aureus* BMC-1 and *Proteus vulgaris* ПA-12 of surfactants, synthesized in the presence of Zn^{2+} , and the adhesion of *E. coli* IEM-1 on abiotic surfaces treated with such surfactants, were respectively in 1.6–3.3 times and 10–19 % lower than those of the preparations obtained under cultivation of IMV B-7241 strain in medium without zinc cations. The activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase at the end of exponential phase of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 growth in medium with ethanol (n-hexadecane), copper, zinc and iron sulfate, was 1739 ± 87 (8333 ± 416) $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein that in 2 and 15 times higher than under the same conditions cultivation on ethanol and n-hexadecane without Zn^{2+} . **Conclusions.** The obtained data suggest the possibility of biosynthesis regulation of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants with antimicrobial and antiadhesive properties, when zinc cations (activator NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase – a key enzyme of aminolipids synthesis) were added into medium with ethanol (n-hexadecane), as well as the possibility of regulating the biological properties of the surfactants during cultivation of producer.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, surfactants, zinc cations, activity of glutamate dehydrogenase, antimicrobial and antiadhesive activity.

1. Pirog T.P., Savenko I.V., Shevchuk T.A. Effect of cultivation condition of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on antiadhesive properties of surfactants. *Microbiol. Zh.* 2016; **79**(1): 2–12.
2. Pirog T.P., Savenko I.V., Shevchuk T.A., Krutous N.V., Iutynska G.O. Antimicrobial properties surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiol. Zh.* 2016; **79**(3): 2–12.
3. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Mashchenko O.Yu., Parfenyuk S.A., Iutinskaya G.A. Effect of growth factors and some microelements on biosurfactant synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiol. Zh.* 2013; **75**(5): 19–27.
4. Cortes-Sanchez A., Hernandez-Sanchez H., Jaramillo-Flores M. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol. Rec.* 2013; **168**(1): 22–32.
5. Meena K.R., Kanwar S.S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed. Res. Int.* 2015. doi: 10.1155/2015/473050.
6. Pirog T.P., Konon A.D., Beregovaya K.A., Shulyakova M.A. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Microbiology.* 2014; **83**(6): 732–739.
7. Pirog T.P., Beregova K.A., Savenko I.V., Shevchuk T.A., Iutynska G.O. Antimicrobial action of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Microbiol. Zh.* 2015; **78**(6): 2–10.
8. Hudson R.C., Ruttersmith L.D., Daniel R.M. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; **1202**(2): 244–250.

9. Lee M.K., González J.M., Robb F.T. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs. *Extremophiles*. 2002; **6**(2): 151–159.
10. Bhuiya M.W., Sakuraba H., Kujo C., Nunoura-Kominato N., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Ohshima T. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications. *Extremophiles*. 2000; **4**(6): 333–341.
11. Sarada K.V., Rao N.A., Venkatasubramanian T.A. Isolation and characterisation of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46. *Biochim. Biophys. Acta*. 1980; **615**(2): 299–308.
12. Lin H.P.P., Reeves H.C. Purification and characterization of NADP⁺-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 1991; **22**(6): 371–376.
13. Choudhury R., Punekar N.S. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli*. *Mycol. Res.* 2009; **113**(10): 1121–1126. doi: 10.1016/j.mycres.2009.07.009.
14. Singh A.K., Rautela R., Cameotra S.S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microb. Cell. Fact.* 2014. doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
15. Zhihui X., Jiahui S., Bing L., Xin Y., Qirong S. and Ruifu Z. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; **79**(3): 808–815. doi: 10.1128/AEM.02645-12.
16. Mandal S.M., Barbosa A.E., Franco O.L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnol. Adv.* 2013; **31**(2): 338–345. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.
17. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Antonyuk S.I., Kravchenko Ye.Yu., Iutiynska G.O. Effect of univalent cations on synthesis of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiol. Zh.* 2013; **75**(2): 10–20.
18. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010; **46**(6): 599–606.
19. Huang X., Liu J., Wang Y., Liu J., Lu L. The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2015; **29**(2): 381–389.
20. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; **97**(6): 2327–2339.

Отримано 03.03.2016