УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог [1,2], Л.В. Никитюк [1], Т.А. Шевчук [2]

[1]Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна
[2]Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ВПЛИВ ДВОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 З ВИСОКОЮ АНТИМІКРОБНОЮ ТА АНТИАДГЕЗИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

Мета. *Дослідження впливу двовалентних катіонів на НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність (ключовий фермент біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів у Nocardia vaccinii IMB B-7405) з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) з високою антимікробною та антиадгезивною активністю.* ***Методи****. НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність (КФ 1.4.1.4) у безклітинному екстракті аналізували за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Антимікробні щодо бактерій та дріжджів властивості ПАР визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Кількість адгезованих клітин мікроорганізмів визначали спектрофотометричним методом.* ***Результати.*** *Встановлено, що за наявності 5−10 мМ катіонів кальцію у безклітинному екстракті N. vaccinii IMB B-7405 НАДФ$^+$-залежна глутаматдегідрогеназна активність підвищувалася в 1,3−1,7 разів у порівнянні з такою без Ca^{2+}. Збільшення в середовищі культивування штаму IMB B-7405 концентрації $CaCl_2 \times 2H_2O$ з 0,1 до 0,4 г/л супроводжувалося підвищенням НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності у 1,5 рази, а також посиленням антимікробної і антиадгезивної активності синтезованих ПАР. Мінімальна інгібуюча концентрація щодо деяких бактерій та дріжджів поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі з підвищеним вмістом Ca^{2+}, була у 1,8−13 разів, а адгезія тест-культур на абіотичних поверхнях, оброблених такими ПАР, − у середньому на 7−39% нижчою у порівнянні з показниками, встановленими для ПАР, утворених на базовому середовищі.* ***Висновки.*** *Одержані результати засвідчують можливість регуляції антимікробної та антиадгезивної активності мікробних ПАР зміною у середовищі культивування продуцента вмісту катіонів – потенційних активаторів і/або інгібіторів ключових ферментів біосинтезу компонентів ПАР, відповідальних за дані біологічні властивості.*

Ключові слова: Nocardia vaccinii IMB B-7405, поверхнево-активні речовини, антимікробна та антиадгезивна активність, активність ключових ферментів біосинтезу.

У попередніх дослідженнях [1−5] було встановлено, що зміна умов культивування продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалася зміною антимікробної та антиадгезивної активності синтезованих ПАР. Однією з причин різних біологічних властивостей цільового продукту

© Т.П. Пирог, Л.В. Никитюк, Т.А.Шевчук, 2017

може бути змінення вмісту у їх складі поверхнево-активних аміноліпідів, ключовим ферментом біосинтезу яких у штамів IMB B-7241 і IMB B-7405 є НАДФ$^+$-залежна глутаматдегідрогеназа [3−5]. У роботі [4] було встановлено, що внесення Zn^{2+} (активатора цього ферменту у *A. calcoaceticus* IMB B-7241) в середовище культивування з етанолом і *н*-гексадеканом супроводжувалося підвищенням антимікробної та антиадгезивної активності синтезованих ПАР.

У зв'язку з цим мета даної роботи − дослідження впливу двовалентних катіонів на НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність (ключовий фермент біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів у *N. vaccinii* IMB B-7405) з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища для синтезу ПАР з високою антимікробною та антиадгезивною активністю.

Матеріали та методи. Основний об'єкт досліджень – штам *N. vaccinii* IMB B-7405, зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером IMB B-7405.

N.vaccinii IMB B-7405 вирощували в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $NaNO_3$ – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001, дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка). В одному з варіантів концентрацію хлориду кальцію у середовищі культивування підвищували до 0,2 і 0,4 г/л. Як джерело вуглецю використовували очищений гліцерин у концентрації 2% (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5% субстрату. Інокулят, в якому чисельність бактерій становила 10^4–10^5 кл/мл, вносили у кількості 10% від об'єму середовища.

Культивування здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30ºС упродовж 5 діб.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини, екстраговані з супернатанту сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1), як описано у наших попередніх роботах [1−5].

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів, як описано нами раніше [2−5].

Визначення антиадгезивних властивостей ПАР здійснювали, як наведено у наших попередніх дослідженнях [1, 2]. Кількість адгезованих клітин (адгезія) визначали спектрофотометричним методом як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР (супернатант, розчин ПАР) матеріалів (пластик, кахель, сталь, лінолеум), до оптичної густини контрольних зразків (без обробки ПАР) і виражали у відсотках.

Як тест-культури під час визначення антимікробних та антиадгезивних властивостей ПАР використовували штами бактерій (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. MI-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3) і дріжджів

(*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* БВС-65) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 у рідкому середовищі, центрифугували (5000 g, 20 хв, 4°С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+-фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4°С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+-фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4°С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000g, 30 хв, 4°С), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність (КФ 1.4.1.4) у безклітинному екстракті аналізували за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм [6]. При дослідженні впливу катіонів на активність ферменту в реакційну суміш вносили 0,001–0,01 мМ Mn^{2+} і Zn^{2+} у вигляді розчину солей $MnSO_4 \times H_2O$ і $ZnSO_4 \times 7H_2O$, а також 0,01–10 мМ Ca^{2+} і Mg^{2+} у вигляді розчину солей $CaCl_2$ і $MgSO_4 \times 7H_2O$.

НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність аналізували при 28–30°С – температурі, оптимальній для росту *N. vaccinii* IMB B-7405.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у попередніх роботах [1–5]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p<0,05$.

Результати та обговорення. У табл. 1 наведено дані щодо НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності у безклітинному екстракті *N. vaccinii* IMB B-7405 за наявності різних двовалентних катіонів. Вибір катіонів зумовлений тим, що, згідно з літературними даними [7–9], вони (в досліджуваному нами діапазоні концентрацій) є інгібіторами або активаторами НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази у різних мікроорганізмів. Так, у архей *Thermococcus* sp. активність цього ферменту підвищувалася за присутності 5 мМ $CaCl_2$, $MgCl_2$ і $MnCl_2$ [7]. Пізніше [8] було встановлено, що катіони кальцію і магнію також є активаторами НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази і у архей *Thermococcus waiotapuensis*: за наявності 10 мМ $CaCl_2$ і 10 мМ $MgSO_4$ спостерігали збільшення активності в 1,3 рази в порівнянні з такою без катіонів металів. За наявності катіонів цинку спостерігали підвищення активності НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [4].

Дані, наведені у табл. 1, засвідчують, що з усіх досліджуваних двовалентних катіонів тільки катіони кальцію виявилися активаторами НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності у *N. vaccinii* IMB B-7405, причому активаційний вплив Ca^{2+} проявлявся в широкому діапазоні концентрацій (0,01–10 мМ).

На наступному етапі аналізували НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність у безклітинному екстракті *N. vaccinii* IMB B-7405, одержаному з клітин, вирощених у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію (табл. 2).

Таблиця 1

Вплив катіонів на НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність у безклітинному екстракті *N. vaccinii* IMB B-7405

Катіони	Концентрація у реакційній суміші, мМ	Активність, нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку
Без катіонів	0	476±23
Ca^{2+}	0,01	794±39
	5	635±32
	10	794±39
Mg^{2+}	0,01	450±22
	5	464±23
	10	476±23
Mn^{2+}	0,001	159±8
	0,005	140±7
	0,01	240±12
Zn^{2+}	0,001	238±11
	0,005	238±11
	0,01	159±8

Примітка: Активність визначали у безклітинному екстракті, одержаному з клітин, які перебували у середині експоненційної фази росту.

Таблиця 2

НАДФ$^+$-залежна глутаматдегідрогеназна активність у безклітинному екстракті *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від концентрації катіонів кальцію у середовищі культивування

Концентрація $CaCl_2 \times 2H_2O$ у середовищі, г/л	Активність (нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білку) у безклітинному екстракті, одержаному з клітин, що перебували у фазі росту	
	середині експоненційної	початку стаціонарної
0,1 (базове середовище)	556±27	464±23
0,2	600±30	423±21
0,4	870±43	598±30

Експерименти показали, що у разі підвищення у середовищі культивування штаму IMB B-7405 концентрації $CaCl_2 \times 2H_2O$ до 0,4 г/л НАДФ$^+$-залежна глутаматдегідрогеназна активність збільшувалася в 1,3−1,6 разів у порівнянні з активністю в екстракті, одержаному з клітин *N. vaccinii* IMB B-7405, вирощених у базовому середовищі, що містило 0,1 г/л хлориду кальцію.

Зазначимо, що реальний вміст катіонів у клітинах бактерій відрізняється від їх концентрації в середовищі культивування, як і величина ферментативної активності в безклітинному екстракті не завжди відповідає швидкості реального процесу в інтактних клітинах, яка залежить не тільки від вмісту ферменту, а й від пулу субстратів, регуляції ферменту і т.і. Разом з тим підвищення в середовищі культивування *N. vaccinii* IMB

B-7405 концентрації потенційних активаторів НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази супроводжувалося збільшенням цієї активності у безклітинному екстракті досліджуваного штаму.

Результати, наведені у табл. 1 і 2, дали змогу припустити, що антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих у процесі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі зі збільшеним вмістом хлориду кальцію, буде вищою у порівнянні з активністю ПАР, одержаних на базовому середовищі. Наступні експерименти підтвердили це припущення (табл. 3 і 4).

Таблиця 3

Антимікробна активність ПАР, синтезованих *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі з різним вмістом катіонів кальцію

Мікроорганізми	Тест-культура	МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих у середовищі, що містило $CaCl_2 \times 2H_2O$ (г/л)	
		0,1 (базове)	0,4
Бактерії	*Bacillus subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини)	45	12,5
	Bacillus subtilis БТ-2 (спори)	90	50
	Pseudomonas sp. МІ-2	90	50
	Staphylococcus aureus БМС-1	90	6,8
	Erwinia aroideae Н-3	90	12,5
	Enterobacter cloacae С-8	180	25
Дріжджі	*Candida albicans* Д-6	90	25
	Candida tropicalis РЕ-2	45	25
	Candida utilis БВС-65	11,5	3,4

Примітка: Під час визначення МІК похибка не перевищувала 5%.

Так, мінімальна інгібуюча концентрація щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур ПАР, синтезованих у середовищі, що містило 0,4 г/л $CaCl_2 \times 2H_2O$, була в 1,8–13 разів, а щодо дріжджів роду *Candida* – в 1,8–3,6 разів нижчою, ніж МІК поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі з нижчою концентрацією катіонів кальцію (табл. 3).

Згідно літературних даних [10–13] найактивнішими серед поверхнево-активних речовин антимікробними агентами є аміноліпіди, синтезовані представниками роду *Bacillus*. Порівняння одержаних нами результатів (табл. 3) з літературними даними [10–12] показало, що ПАР, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі з підвищеним вмістом катіонів кальцію, не поступаються, а іноді й перевершують за антимікробною активністю аміноліпіди бактерій роду *Bacillus.* Так, мінімальна інгібуюча концентрація щодо різних штамів *C. albicans* ітуріну, поліпептину і фенгіцину становить 40, 6,25 і 15,6 мкг/мл відповідно, МІК щодо *S. aureus* поліпептину, октапептину, фузаріцидіну – 6,3, 50 і 8–16 мкг/мл відповідно [10]. Сурфактин *B. subtilis* I'1a у концентрації 100–200 мкг/мл інгібував на 10–40% ріст уропатогенних штамів *E. coli*, *Enterobacter cloacae* і *Serratia marcescens* [12].

Таблиця 4

Вплив розчинів ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, синтезованих у середовищі з різним вмістом катіонів кальцію, на прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь

Концентрація $CaCl_2 \times 2H_2O$ у середовищі (г/л)	Тест-культура	Концентрація ПАР, мг/мл	Адгезія, %			
			пластик	кахель	сталь	лінолеум
0,1 (базове)	*B. subtilis* БТ-2 (спори)	0,02	28	36	30	57
		0,005	64	54	45	76
	E. coli ІЕМ-1	0,02	39	62	32	Н.в.
		0,0025	53	93	45	28
	C. albicans Д-6	0,02	62	66	79	44
		0,0025	56	63	55	45
0,4	*B. subtilis* БТ-2 (спори)	0,02	46	80	75	69
		0,005	31	44	30	Н.в.
	E. coli ІЕМ-1	0,02	30	21	18	11
		0,0025	36	54	31	21
	C. albicans Д-6	0,02	52	56	46	36
		0,0025	48	51	42	31

Примітка. Н.в. – не визначали. Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %.

На наступному етапі аналізували антиадгезивну активність ПАР, синтезованих у процесі вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі з різним вмістом катіонів кальцію. У попередніх дослідженнях [2, 5] було встановлено, що за обробки абіотичних поверхонь розчинами поверхнево-активних речовин (0,02–0,04 мг/мл), синтезованих штамом IMB B-7405 на базовому середовищі з різними субстратами (рафінована і відпрацьована соняшникова олія різної якості, очищений та технічний гліцерин), адгезія деяких бактерій і дріжджів не перевищувала в середньому 35−50%.

Експерименти показали, що розчини ПАР (0,02 мг/мл), синтезованих у середовищі з підвищеним вмістом катіонів кальцію, у деяких випадках виявилися ефективнішими антиадгезивними агентами, ніж ПАР, одержані на базовому середовищі: так, адгезія *E. coli* ІЕМ-1 на різних поверхнях становила 11−30 і 32−62, *C. albicans* Д-6 − 36−56 і 44−79% відповідно (табл. 4). У той же час кількість прикріплених спорових клітин *B. subtilis* до абіотичних поверхонь, оброблених такими ПАР, була вищою, ніж за використання поверхнево-активних речовин, синтезованих у базовому середовищі (46−80 і 28−57% відповідно). Проте у разі зниження до 0,005−0,0025 мг/мл концентрації ПАР, одержаних на середовищі з підвищеним вмістом катіонів кальцію, адгезія *B. subtilis* БТ-2, *E. coli* ІЕМ-1 і *C. albicans* Д-6 на усіх поверхнях була на 15−32, 7−39 і 12−14% відповідно нижчою, ніж після обробки поверхнево-активними речовинами, синтезованими у базовому середовищі.

У нещодавно опублікованому огляді [14] ми проаналізували літературу останніх років щодо антиадгезивних властивостей мікробних поверхнево-активних речовин: гліколіпідів (рамно- і софороліпілів), аміноліпідів, синтезованих бактеріями родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, а також ПАР молочнокислих бактерій. Найефектив-

нішими антиадгезивними агентами на теперішній час є аміноліпіди представників роду *Bacillus* [15, 16]. Так, Rivardo із співавт. [15] описали вплив ліпопептидів, синтезованих *B. subtilis* V19T21 та *Bacillus licheniformis* V9T14, на прикріплення *Staphylococcus aureus* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 і *Staphylococcus epidermis* TI23 до полівінілхлориду, який використовується для первинної упаковки лікарських засобів. Адгезію *E. coli* CFT073 ефективно знижував препарат ПАР штаму V9T14 (2,6 мкг/мл): кількість прикріплених клітин не перевищувала 7%. Проте ліпопептид *B. licheniformis* V9T14 не попереджав колонізацію поверхні іншими тест-культурами (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* PA14, *S. epidermis* TI23). Науковці встановили, що ПАР *B. subtilis* V19T21 (5–25 мкг/мл) виявляли антиадгезивну активність щодо ширшого спектру бактерій, ніж ПАР *B. licheniformis* V9T14: так, після обробки поверхні поверхнево-активними речовинами штаму V19T21 кількість прикріплених до полівінілхлоридної поверхні клітин *E. coli* CFT073, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* PA14 і *S. epidermis* TI23 не перевищувала 10% [15].

У 2013 р. Ajesh із співавт. [16] виділили штам бактерій *B. cereus* AK1, здатний до синтезу ліпопептиду, який за хімічним складом відрізнявся від сурфактину та ітурину. Синтезований штамом AK1 ліпопептид автори запропонували назвати канурин. У ході роботи встановлено здатність канурину (0,25–512 мкг/мл) попереджати прикріплення дріжджів *C. albicans* LK3 та *Cryptococcus neoformans* BM8 до силіконової поверхні. Так, за обробки матеріалу препаратами ПАР (2–64 мкг/мл) адгезію тест-культур вдалося знизити на 25–75% [16].

Отже, встановлений у даній роботі антиадгезивний потенціал поверхнево-активних речовин, синтезованих під час культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі з підвищеним вмістом катіонів кальцію, є порівняним з таким аміноліпідів, синтезованих бактеріями роду *Bacillus*.

У попередній роботі [4] ми зазначали, що до теперішнього часу у літературі є лише поодинокі відомості про можливість регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР, причому лише шляхом одержання генно-інженерних штамів, які синтезують певні складові комплексу ПАР, відповідальні за ті чи інші властивості, або в результаті постферментаційної хімічної модифікації цільового продукту.

Наведені у даній роботі результати узгоджуються з одержаними раніше [4] і засвідчують можливість регуляції антимікробної та антиадгезивної активності мікробних ПАР зміною у середовищі культивування продуцента вмісту катіонів – потенційних активаторів і/або інгібіторів ключових ферментів біосинтезу компонентів ПАР, відповідальних за дані біологічні властивості.

Т.П. Пирог [1,2], Л.В. Никитюк [1], Т.А.Шевчук [2]

[1]Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина
[2]Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 С ВЫСОКОЙ АНТИМИКРОБНОЙ И АНТИАДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Резюме

Цель. Исследование влияния двухвалентных катионов на НАДФ$^+$-зависимую глутаматдегидрогеназную активность (ключевой фермент биосинтеза поверхностно-активных аминолипидов у *Nocardia vaccinii* IMB B-7405) с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) с высокой антимикробной и антиадгезивной активностью. **Методы**. НАДФ$^+$-зависимую глутаматдегидрогеназную активность (КФ 1.4.1.4) в бесклеточном экстракте анализировали по образованию глутамата при окислении НАДФН при 340 нм. ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Антимикробные по отношению к бактериям и дрожжам свойства ПАВ определяли по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Количество адгезированных клеток микроорганизмов определяли спектрофотометрическим методом. **Результаты.** Установлено, что при наличии 5−10 мМ катионов кальция в бесклеточном экстракте НАДФ$^+$-зависимая глутаматдегидрогеназная активность *N. vaccinii* IMB B-7405 повышалась в 1,3−1,7 раза по сравнению с таковой без Ca^{2+}. Повышение в среде культивирования штамма IMB B-7405 концентрации $CaCl_2 \times 2H_2O$ с 0,1 до 0,4 г/л сопровождалось увеличением НАДФ$^+$-зависимой глутаматдегидрогеназной активности в 1,5 раза, а также усилением антимикробной и антиадгезивной активности синтезированных ПАВ. Минимальная ингибирующая концентрация по отношению к некоторым бактериям и дрожжам поверхностно-активных веществ, синтезированных в среде с повышенным содержанием Ca^{2+}, была в 1,8−13 раз, а адгезия тест-культур на абиотических поверхностях, обработанных такими ПАВ, − в среднем на 7−39% ниже по сравнению с показателями, установленными для ПАВ, полученных на базовой среде. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о возможности регуляции антимикробной и антиадгезивной активности микробных ПАВ при изменении в среде культивирования продуцента содержания катионов – потенциальных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза компонентов ПАВ, ответственных за данные биологические свойства.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, антимикробная и антиадгезивная активность, активность ключевых ферментов биосинтеза.

T.P. Pirog [1,2], L.V. Nikituk [1], T.A. Shevchuk

[1] National University of Food Technologies,
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine
[2] Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

INFLUENCE OF DIVALENT CATIONS ON SYNTHESIS OF *NOCARDIA VACCINII* IMVB-7405 SURFACTANTS WITH HIGH ANTIMICROBIAL AND ANTI-ADHESION ACTIVITY

Summary

Aim. To study the effect of divalent cations on $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity (key enzyme of biosynthesis of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surface-active aminolipids) followed by appropriate modification of medium composition for synthesis of surfactants with high anti-adhesive and antimicrobial activity. **Methods.** The $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity (EC 1.4.1.4) in the cell-free extract was analyzed for the formation of glutamate in the oxidation of NADPH at 340 nm. Surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2:1). Antimicrobial against bacteria and yeast properties of the surfactant was determined by index of the minimum inhibitory concentration (MIC). The number of attached cells was determined spectrophotometrically. **Results.** It was established that in the presence of 5−10 mM calcium cations $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity in the cell-free extract of *N. vaccinii* IMV B-7405 increased to 1.3−1.7 times in comparison with that without Ca^{2+}. Increase from 0.1 to 0.4 g/l $CaCl_2 \times 2H_2O$ concentration in cultivation medium of IMV B-7405 strain was accompanied by rise of $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity in 1.5 times, as well as increasing antimicrobial and anti-adhesive activity of synthesized surfactants. Minimum inhibitory concentration against some bacteria and yeasts surfactants synthesized in a medium with a heightened content of Ca^{2+} was in 1,8−13 times and adhesion test cultures on abiotic surfaces treated with such surfactants − an average of 7−39 % lower as compared to indicators for the surfactant produced in the base medium. **Conclusions**. The obtained results indicate the possibility of regulation of the antimicrobial and anti-adhesive activity of microbial surfactants with the change in cultivation medium of cations content – potential activators and/or inhibitors of key enzymes biosynthesis of surfactant components responsible for these biological properties.

Key words: Nocardia vaccinii IMV B-7405, surfactants, antimicrobial and anti-adhesive activity, activity of key enzymes biosynthesis.

1. *Pirog T.P., Savenko I.V., Shevchuk T.A.* [Effect of cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on surfactants antiadhesive properties]. Microbiol. Zh. 2016; 78(1): 2−12. Russian.
2. *Pirog T.P., Nikituk L.V., Tymoshuk K.V., Shevchuk T.A., Iutynska G.O.* [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on fried sunflower oil]. Microbiol. Zh. 2016; 78(2): 2–12. Ukrainian.
3. *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; 78(3): 2–12. Ukrainian.

4. *Pirog T.P., Savenko I.V., Shevchuk T.A.* [Effect of Zn^{2+} on synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants with antimicrobial and antiadhesive properties]. Microbiol. Zh. 2016; 78(4): 49–58. Russian.
5. *Pirog T.P., Nikituk L.V., Iutynska G.O.* [Bological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on byproduct of biodiesel production]. Microbiol. Zh. 2016; 78(5): 12–20. Ukrainian.
6. *Shiio I., Ozaki H*. Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. J. Biochem. 1970; 68(5): 633−647.
7. *Hudson R.C., Ruttersmith L.D., Daniel R.M.* Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaebacterial isolate AN1. Biochim. Biophys. Acta. 1993; 1202(2): 244–250.
8. *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.
9. *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.
10. *Cochrane S.A., Vederas J.C*. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. Med. Res. Rev. 2016; 36(1): 4–31. doi 10.1002/med.21321.
11. *Bernat P., Paraszkiewicz K., Siewiera P., Moryl M., Płaza G., Chojniak J.* Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 2016; 32(10). doi: 10.1007/s11274-016-2126-0.
12. *Moryl M., Spętana M., Dziubek K., Paraszkiewicz K., Różalska S., Płaza G.A., Różalski A*. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. Acta Biochim. Pol. 2015; 62(4):725−32. doi: 10.18388/abp.2015_1120.
13. *Hamley I. W*. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. Chem. Commun. 2015; 51: 8574−8583. doi: 10.1039/c5cc01535a.
14. *Pirog T.P., Savenko I.V., Lutsay D. A*. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents. Biotechnologia acta. 2016; 9(3): 7−22. doi: org/10.15407/biotech9.03.007.
15. *Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G*. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009; 83(3): 541–553.
16. *Ajesh K., Sudarslal S., Arunan C., Sreejith K.* Kannurin, a novel lipopeptide from *Bacillus cereus* strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities. J. Appl. Microbiol. 2013; 115(6): 1287–1296. doi: 10.1111/jam.12324.

Отримано 22.12.2016