

SYNTHESIS OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 SURFACTANTS ON HYDROCARBON SUBSTRATES WITH COPPER CATIONS

T. Pirog, A. Konon, S. Parfenuk
National University of Food Technologies

Key words: <i>Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241</i> <i>Biosurfactants</i> <i>Heavy metals</i> <i>Intensification of synthesis</i> <i>Cultivation</i>	ABSTRACT The synthesis of surface-active substances (surfactants) of IMB B-7241 on hydrocarbon substrates (n-hexadecane, liquid paraffins) with Cu^{2+} (1.0—2.0 mM) was investigated. It was established that independent of copper cations concentration and time of their introduction (exponential and stationary phase) into a medium with n-hexadecane and liquid paraffins the increasing synthesis of surfactant in 1.6—2.4 times as compared with the cultivation of the strain IMB B-7241 without Cu^{2+} was observed. The maximum concentration of surfactants (up to 4.4—4.6 g/l) was achieved when adding 2.0 mM Cu^{2+} in the stationary growth phase of <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241. Reinoculation of <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 cells grown with copper cations into medium without Cu^{2+} was not accompanied by increasing synthesis of a surfactant.
Article history: Received 30.09.2014 Received in revised form 12.10.2014 Accepted 25.10.2014	
Corresponding author: T. Pirog E-mail: tapirog@nuft.edu.ua	

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 НА ВУГЛЕВОДНЕВИХ СУБСТРАТАХ ЗА НАЯВНОСТІ КАТІОНІВ МІДІ

Т.П. Пирог, А.Д. Конон, С.А. Парфенюк
Національний університет харчових технологій

*У статті досліджено синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 на вуглеводневих субстратах (n-гексадекан, рідкі парафіни) за наявності Cu^{2+} (1,0—2,0 мМ). Встановлено, що незалежно від концентрації катіонів міді і моменту їх внесення (експоненційна і стаціонарна фаза) у середовище з n-гексадеканом і рідкими парафінами спостерігали підвищення концентрації ПАР у 1,6—2,4 раза порівняно з вирощуванням штаму IMB B-7241 на середовищі без Cu^{2+} . Максимальна концентрація поверхнево-активних речовин (до 4,4—4,6 г/л) досягалася у разі додавання 2,0 мМ Cu^{2+} у стаціонарній фазі росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Пересів клітин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, вирощених за наявності катіонів міді, на середовище без Cu^{2+} не супроводжувався підвищенням синтезу ПАР.*

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, поверхнево-активні речовини, важкі метали, інтенсифікація синтезу, культивування.

У попередніх дослідженнях [1] було встановлено, що додавання невисоких (0,01—0,5 мМ) концентрацій Cu^{2+} в експоненційній фазі росту *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гідрофобних (*n*-гексадекан, рідкі парафіни, соняшникова олія) і гідрофільних (етанол) супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР на 25—140 % порівняно з показниками на середовищі без катіонів міді. Максимальна інтенсифікація синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 спостерігалася у разі внесення Cu^{2+} у середовище з вуглеводнями.

Підвищення синтезу ПАР за наявності катіонів міді зумовлене їхнім впливом на активність алкангідроксилази обох штамів, а також 4-нітрузо-*N*, *N*-диметиланілін-залежної алкогольдегідрогенази та ферментів біосинтезу поверхнево-активних гліко- (фосфоенілпіруватсинтетаза) та аміноліпідів (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [1].

Останніми роками у літературі з'являється все більше повідомлень про використання мікробних ПАР у природоохоронних технологіях для видалення як важких токсичних металів, так і комплексних забруднень, що містять різні вуглеводні та метали [2—5]. У той же час практично відсутні публікації, в яких дослідження росту мікроорганізмів і утворення метаболітів за наявності важких металів, а також концентрація металу і момент його внесення у середовище культивування розглядалися б як фактори інтенсифікації біотехнологічних процесів.

Так, відомо [6, 7], що Cu^{2+} виконує ключову роль у фізіології й активності метанотрофів. Окиснення метану в метанотрофів здійснюється мембран-зв'язаною і/чи розчинною метанмонооксигеназою, яка належить до класу алкангідроксилаз, як і ферменти катаболізму *n*-алканів. У метанотрофів, що мають обидві метанооксигенази, Cu^{2+} є ключовим фактором як у регуляції експресії генів, відповідальних за їх синтез, так і в регуляції активності цих ферментів. Крім того, для багатьох метанотрофів встановлена залежність показників росту (швидкість росту, концентрація біомаси, економічний коефіцієнт) від вмісту катіонів міді у середовищі культивування.

Оскільки за даними попередніх досліджень максимальна інтенсифікація синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності катіонів міді спостерігалася на гідрофобних субстратах [1], то **мета даної роботи** — дослідження впливу вищих концентрацій Cu^{2+} на синтез поверхнево-активних метаболітів за умов росту штаму ІМВ В-7241 на *n*-гексадекані і рідких парафінах.

Матеріали і методи. Для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 використовували поживне середовище такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 1,0, Na_2HPO_4 — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 (об'ємна частка) [8]. Джерело вуглецю — *n*-гексадекан і рідкі парафіни в концентрації 2 % (об'ємна частка). В експоненційній і

стаціонарній фазі росту у середовище з *n*-гексадеканом і рідкими парафінами вносили 1,0—2,0 мМ Cu^{2+} у вигляді 1М розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Як інокулянт використовували культуру з експоненційної фази (48 год), виращену на середовищі наведеного вище складу з 0,5 % (об'ємна частка) субстрату, або культуру з стаціонарної фази (120 год), виращену на середовищі з 2 % *n*-гексадекану чи рідких парафінів за присутності Cu^{2+} (1,0—2,0 мМ). Кількість посівного матеріалу (10^4 — 10^5 кл/мл) становила 10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28—30 °С упродовж 120 год.

Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча. Культуральну рідину, отриману після культивування штаму ІМВ В-7241, центрифугували при 5000g упродовж 20 хв для відділення біомаси. 25 мл супернатанту поміщали в циліндричну ділільну воронку об'ємом 100 мл, додавали 5 мл 1М HCl , воронку закривали пришліфованою пробкою і струшували 3 хв, потім додавали ще 4 мл 1М HCl і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (з метою екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. Під час повторної екстракції до водної фази додавали 9 мл 1М HCl і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирали нижню фракцію й отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 змішували і випарювали на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з перерахунком на суху біомасу за калібрувальним графіком. ПАР-синтезувальну здатність визначали як відношення концентрації ПАР (г/л) до концентрації біомаси (г/л) і виражали у г ПАР/г біомаси.

Емульгувальні властивості (індекс емульгування) досліджуваних зразків визначали так: до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл соняшникової олії (субстрат для емульгування) та струшували впродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування (E_{24}) проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках.

Результати і обговорення. У табл. 1 наведено показники синтезу поверхнево-активних речовин за внесення у середовище з вуглеводневими субстратами різних концентрацій катіонів міді. Незалежно від концентрації катіонів міді, моменту їх додавання у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 та природи вуглецевого субстрату, концентрація синтезованих ПАР була більш ніж удвічі вищою, а ПАР-синтезувальна здатність — у 3—5 разів вищою, ніж на відповідних середовищах без Cu^{2+} . Зазначимо, що за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рідких парафінах з внесенням катіонів міді індекс емульгування культураль-

ної рідини залишався практично незмінним (58—62 %), а на *n*-гексадекані був на 5—15 % вищим, ніж в аналогічних умовах культивування без Cu^{2+} (табл. 1).

*Таблиця 1. Вплив різних концентрацій Cu^{2+} на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на вуглеводневих субстратах*

Субстрат	Момент внесення Cu^{2+} (фаза росту)	Концентрація Cu^{2+} , мМ	г ПАР/г біомаси	ПАР, г/л	E_{24} , %
<i>n</i> -Гексадекан	—	0	2,2±0,11	1,8±0,09	50±2,5
	Експоненційна	1,0	8,2±0,41	3,3±0,17	55±2,7
		1,5	8,5±0,42	3,4±0,17	54±2,7
		2,0	12,0±0,60	3,6±0,18	58±2,9
	Стационарна	1,0	8,2±0,40	4,1±0,20	66±3,3
		1,5	7,6±0,38	4,2±0,21	60±3,0
2,0		11,0±0,55	4,4±0,22	63±3,1	
Рідкі парафіни	—	0	2,4±0,12	2,0±0,10	60±3,0
	Експоненційна	1,0	6,2±0,31	3,7±0,19	58±2,9
		1,5	7,6±0,38	3,8±0,19	59±2,9
		2,0	13±0,65	3,9±0,19	62±3,1
	Стационарна	1,0	7,0±0,35	4,2±0,21	62±3,1
		1,5	6,8±0,34	4,1±0,20	60±3,0
2,0		7,7±0,38	4,6±0,22	61±3,0	

Показники синтезу ПАР після пересіву клітин, вирощених упродовж 120 год за наявності Cu^{2+} , на середовище без катіонів міді наведено у табл. 2. Як засвідчують наведені дані, у разі використання посівного матеріалу, вирощеного за наявності Cu^{2+} , кількість синтезованих ПАР та індекс емульгування практично не змінювалися порівняно з використанням інкуляту, вирощеного на середовищі без катіонів міді (див. табл. 1 і 2). У той же час за таких умов культивування спостерігали певне зниження ПАР-синтезувальної здатності порівняно з показниками, одержаними за використання інкуляту з середовища без Cu^{2+} .

*Таблиця 2. Синтез поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 залежно від якості інкуляту*

Субстрат	Спосіб підготовки інкуляту		г ПАР/г біомаси	ПАР, г/л	E_{24} , %
	Момент внесення Cu^{2+} у середовище для одержання інкуляту	Концентрація Cu^{2+} (мМ) у середовищі для одержання інкуляту			
1	2	3	4	5	6
<i>n</i> -Гексадекан	—	0	2,3±0,11	2,1±0,12	62±3,1
	Експоненційна	1,0	5,3±0,26	3,2±0,16	59±2,9
		1,5	5,8±0,29	3,5±0,18	62±3,1
		2,0	6,1±0,35	3,7±0,19	60±3,0
	Стационарна	1,0	6,3±0,32	3,8±0,19	63±3,2
		1,5	5,1±0,25	4,1±0,20	57±2,9
2,0		6,3±0,32	4,4±0,22	56±2,8	

1	2	3	4	5	6
Рідкі парафіни	—	0	2,0±0,10	2,0±0,10	58±2,9
	Експоненційна	1,0	6,0±0,30	4,2±0,21	59±3,0
		1,5	6,8±0,34	4,1±0,21	62±3,1
		2,0	9,0±0,45	4,5±0,22	60±3,0
	Стационарна	1,0	6,0±0,30	4,8±0,24	60±3,0
		1,5	5,5±0,27	4,4±0,22	61±3,0
		2,0	7,0±0,35	4,9±0,24	62±3,1

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок про недоцільність використання посівного матеріалу, вирощеного за наявності Cu^{2+} . Для інтенсифікації синтезу катіони міді достатньо просто вносити у середовище культивування з *n*-гексадеканом або рідкими парафінами в експоненційній і стаціонарній фазі росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Відомо, що іони металів (мікроелементи) необхідні для росту мікроорганізмів і синтезу різних метаболітів, в тому числі й ПАР [8], причому потреба в цих сполуках індивідуальна і повинна встановлюватися експериментально для кожного штаму-продуцента.

Максимальний синтез (понад 18 г/л) рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* АТ10 спостерігався на середовищі, що містить 50 г/л соєвої олії, 4,6 г/л нітрату натрію та 7,4 мг/л катіонів заліза [9]. Дріжджі *Candida bombicola* (продуценти поверхнево-активних софороліпідів) вирощують на середовищі, що містить дріжджовий екстракт, а також мікроелементи Zn^{2+} та Fe^{3+} [10].

Підвищення в 10 разів кількості синтезованого сурфактину спостерігали у разі збільшення концентрації іонів заліза у середовищі культивування *Bacillus subtilis* АТСС 21332 до 4 мМ [11]. Стимулювальна дія Fe^{3+} , а також Mn^{2+} , Mg^{2+} на синтез сурфактину відзначається і в інших працях [8, 12].

Так, сайт Sfr білка, що активує РСР домени сурфактинсинтетази, містить Mg^{2+} , Mn^{2+} , стимулює асиміляцію азоту і поглинання катіонів калію, а також є (як і Fe^{3+}) кофактором ферментів біосинтетичних шляхів у різних штамів *B. subtilis* [12].

Одержані результати є одними з перших, які показують можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів, зокрема ПАР, шляхом внесення катіонів міді у середовище культивування штаму-продуцента.

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено можливість підвищення у 1,6—2,4 раза концентрації позаклітинних поверхнево-активних речовин, синтезованих у процесі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на вуглеводневих субстратах з внесенням в експоненційній або стаціонарній фазі 1,0—2,0 мМ катіонів міді.

Література

1. Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В 7241 и *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 / Т.П. Пурог, А.Д. Конон, А.П. Софилканич [та ін.] // Микробиол. журнал. — 2013. — Т. 75, № 1. — С. 3—13.

2. 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. — Vol. 87, № 2. — P. 427—444.
3. Asci 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. — Vol. 91, № 3. — P. 724—731.
4. Pacwa-Płociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — Vol. 12, № 1. — P. 633—654.
5. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97, № 6. — P. 2327—2339.
6. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Methanotrophs and copper // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2010. — Vol. 34, № 4. — P. 496—531.
7. Torres Pazmino D.E., Winkler M., Glieder A., Fraaije M.W. Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications // *J. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 146, № 1—2. — P. 9—24.
8. *Biosurfactants: From Genes to Applications* / Ed. Soberon-Chavez G. // *Microbiology Monographs.* — Springer, Verlag Berlin Heidelberg. — 2011. — Vol. 20. — 216 p.
9. Müller M.M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 91, № 2. — P. 251—264.
10. Bogaert I.N.A., Zhang J., Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids // *Proc. Biochem.* — 2011. — Vol. 46, № 4. — P. 821—833.
11. Wei Y. H., Wang L.F., Chang J.S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis* // *Biotechnol. Prog.* — 2004. — Vol. 20, № 3. — P. 979—983.
12. Shaligram N.S., Singhal R.S. Surfactin — a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications // *Food Technol. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 48, № 2. — P. 119—134.

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 НА УГЛЕВОДОРОДНЫХ СУБСТРАТАХ В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ МЕДИ

Т.П. Пирог, А.Д. Конон, С.А. Парфенюк

Национальный университет пищевых технологий

*В статье исследован синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на углеводородных субстратах (n-гексадекан, жидкие парафины) в присутствии Cu^{2+} (1,0—2,0 мМ). Установлено, что независимо от концентрации катионов меди и момента их внесения*

(экспоненциальная и стационарная фаза) в среде с *n*-гексадеканом и жидкими парафинами наблюдали повышение синтеза ПАВ в 1,6—2,4 раза по сравнению с выращиванием штамма IMB B-7241 на среде без Cu^{2+} . Максимальная концентрация поверхностно-активных веществ (до 4,4—4,6 г/л) достигалась при добавлении 2,0 мМ Cu^{2+} в стационарной фазе роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Пересев клеток *A. calcoaceticus* IMB B-7241, выращенных в присутствии катионов меди, на среду без Cu^{2+} не сопровождался повышением синтеза ПАВ.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, тяжелые металлы, интенсификация синтеза, культивирование.