

БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН БАКТЕРІЯМИ РОДУ *BACILLUS*

О.В. ІВАНІСЬКО

Національний авіаційний університет, м. Київ

Біосурфактанти (biosurfactants) – поверхнево-активні речовини (ПАР) бактеріального походження з вираженими мультифункціональними властивостями. У статті наведено дані літератури про здатність представників роду Bacillus до синтезу поверхнево-активних речовин та практичного використання їх у промисловості, біології та медицині. Розглянуто характеристику ліпопептидів, синтезованих представниками роду Bacillus.

Ключові слова: *біосурфактанти, Bacillus, ліпопептиди, сурфактин, умови культивування*

Мікробні біосурфактанти мають величезні переваги перед синтетичними зважаючи на їх здатність до кращого розпаду та утилізації, що виключає забруднення навколишнього середовища, меншої чутливості до екстремальних температур, рН і солоності середовища, а також різної біологічної активності та нетоксичності. Однак, в даний час біоПАР широко не виробляються і не застосовуються через їх дороговизну і недостатню вивченість питання.

БіоПАР утворюються мікроорганізмами, що населяють води (морські, прісні, підземні), ґрунти, донні відкладення, осадові породи. Вони синтезуються в екстремальних умовах (наприклад, в ємкостях для масла), і процвітають в широкому діапазоні температур, значних рН і солоності. Вони також виконують фізіологічні ролі, не пов'язані з солюбілізацією гідрофобних забруднювачів; це антимікробна активність, утворення біоплівки або процеси

руху і колонізації поверхонь [15]. Як правило, у бактеріальних популяціях домінує кілька основних родів, таких як *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas* та родів актинобактерій у ґрунтах і осадових породах і *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Alcanivorax* і *Acinetobacter* в морських екосистемах.

БіоПАР є амфіфільними молекулами. До їх складу входить гідрофільна частина, що складається з амінокислот або пептидів, аніонів або катіонів, моно-, ди- або полісахаридів, і гідрофобна частина з ненасичених або насичених жирних кислот [2].

Хімічно синтезовані ПАР класифікують залежно від характеру їх полярної групи, біоПАР – за хімічним складом і походженням.

Мікробні ПАР можуть бути розділені на дві основні групи [6]. У першу входять низькомолекулярні, власне біоПАР або біосурфактанти, такі як гліколіпіди (глюколіпіди, рамноліпіди, трегалозоліпіди, софороліпіди) і ліпопептиди (сурфактин, стрептофактин, поліміксин, граміцидин). До другої відносять високомолекулярні сполуки, які називають емульсанами [13], або біоемульгаторами [12] і представлені полісахаридами, ліпополісахаридами, протеїнами, ліпопротеїнами і їх комплексами [20]. Перша група включає молекули, які ефективно знижують поверхневий і міжфазний натяг. Друга група об'єднує полімери, які більш ефективні для стабілізації емульсій типу «масло у воді» [12, 13].

На сьогоднішній день описано не більше 100 мікробних продуцентів ПАР. З великої кількості відомих біосурфактантів мікробного походження, в промисловому масштабі виробляється лише емульсан, що продукується *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.

Структура і властивості ліпопептидів

Велика група мікробних біоПАР представлена ліпопептидами, які синтезуються у великій різноманітності представниками родів *Pseudomonas* і

Bacillus. Завдяки своїй винятковій здатності взаємодіяти з клітинною мембраною, ліпопептиди добре відомі як протимікробні препарати.

Arima [1, 2] першим відкрив біоПАР – ліпопептид у *Bacillus subtilis* – сурфактин Arima (рис. 1). Він є одним із найбільш високоякісних біоПАР і знижує поверхневий натяг з 72 до 27,9 мН/м при низьких концентраціях близько 0,005 %. Завдяки особливій будові, бацилярний сурфактин є відмінним піноутворювачем.

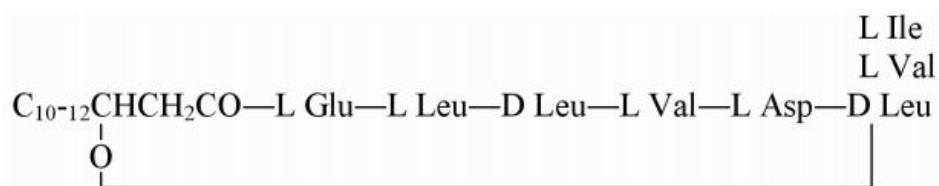


Рис. 1. Структура сурфактину Arima

Сурфактин володіє множинною біологічною активністю. Він здатний до лізису еритроцитів і протопластів бактерій. Крім того, сурфактин інгібує реакцію фібриноген-тромбін, сповільнюючи утворення фібрину. Ця властивість визначає його як можливий компонент при створенні антикоагулюючих засобів для профілактики тромбозів і для запобігання хвороб типу інфаркту міокарда, легеневої емболії і т.д.

Сурфактин проявляє антихолестеразну активність, знижуючи рівень холестерину в плазмі і печінці, має протипухлинну, фунгіцидну і антибіотичну активність. Даний ліпопептид проявляє бактеріостатичні властивості навіть при концентраціях $5 \cdot 10^{-6}$ [5].

Штами *B. subtilis* утворюють ліпопептиди і іншої будови (рис. 2).

За хімічною структурою циклічні ліпопептиди поділяються на лактони, у яких N-кінцевий амінокислотний залишок пептидного ланцюга пов'язаний амідним зв'язком з β-гідроксигірною кислотою, а карбоксильна група C-кінцевої амінокислоти ковалентно замикає кільце, взаємодіючи з β-гідроксильною групою, і лактами, у яких N-кінцевий амінокислотний залишок пептидного ланцюга пов'язаний амідним зв'язком з β-аміножирною кислотою, а C-кінець пептидного ланцюга замкнутий на β-аміногрупу

жирнокислотного залишку [22]. Існують численні варіанти і ізоформи залежно від числа (7-10), типу і послідовності амінокислотних залишків, характеру і типу циклізації пептиду, довжини жирних кислот і розгалуження ланцюга.

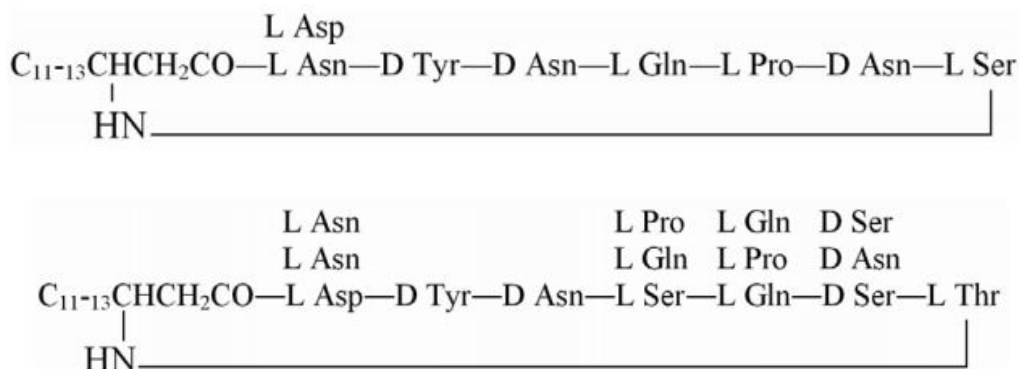


Рис. 2. Структури ліпопептидів *B. subtilis* R14: ітурин А – вгорі; бациломіцин L – внизу

Активність ліпопептидів залежить від їх структурних компонентів, наприклад, типу гідрофільних і гідрофобних груп та їх просторової орієнтації. Невеликі зміни, навіть на рівні однієї амінокислоти, можуть мати значний вплив на загальну поведінку молекули у зв'язку зі змінами гідрофільно-гідрофобного балансу [13]. Так, зміна у сурфактині амінокислоти в положеннях 2, 4 та/або 7 на більш гідрофобні залишки призводить до збільшення поверхневої активності і зниження ККМ (критичної концентрації міцелоутворення).

Крім того, ліпопептиди можуть модулювати бактеріальну гідрофобність. Було висловлено припущення, що ліпопептиди можуть адсорбуватися на поверхні клітин завдяки тому, що циклічний пептид (гідрофільні) або жирні кислоти на кінці хвоста (гідрофобні) змінюють поверхневі властивості в бік посилення гідрофільності або гідрофобності у відповідь на конкретні умови середовища.

Інші ліпопептиди *Bacillus* використовують в медичній галузі. Крім сурфактину *Bacillus subtilis*, це ліхеніформін, поліміксин, граміцидин (рис. 3) –

ліпопептиди з *B. licheniformis*, *B. polymyxa* і *B. brevis*. Ці ліпопептиди широко відомі як антибіотики.

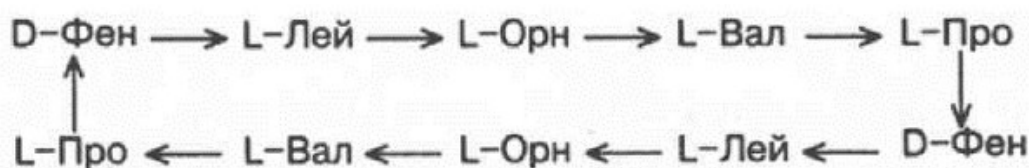


Рис. 3. Структура грамїцидину С *Bacillus brevis*

Крім *Bacillus*, ліпопептиди утворюють і інші бактерії. *P. rubescens* і *Thiobacillus thiooxidans* синтезують орнітинвмісні ліпіди [2]. *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 утворює ліпід, що містить орнітин і таурин [2]. Різні бактерії утворюють ліпопептиди, що включають залишки C20 або C22 жирної кислоти – *Mycobacterium fortuitum*, *M. paratuberculosis*, *Nocardia asteroides*; C10 або C12 жирної кислоти – *Corynebacterium lepus*, *Streptomyces canus*, *S. violaceus*, *P. fluorescens*.

Особливості синтезу ліпопептидів у бактерій роду *Bacillus*

Бактерії, що належать до роду *Bacillus*, можуть бути перспективними продуцентами біоПАР, оскільки вже відомі деякі штами, наприклад, *B. subtilis* і *B. licheniformis*, що продукують ліпопептидні ПАР сурфактин і ліхенізин. Проте, в цілому здатність до утворення біоПАР представниками даного роду вивчена слабо. Встановлено, що серед представників роду *Bacillus* найбільшим потенціалом утворення біоПАР володіють ізоляти виду *B. subtilis*.

Серед культур продуцентів біоПАР можна виділити штами *B. subtilis* ІБ-17, ІБ-18 і ІБ-19, що створюють поверхневий натяг у живильному середовищі 26-27 мН/м. У здатних до біосинтезу біоПАР бактерій і дріжджів при культивуванні на різноманітних джерелах утворюються біосурфактанти, що створюють поверхневий натяг у середовищі порядку 27,6-41,0 мН/м [17, 19]. Таким чином, дані культури проявляють високу поверхневу активність, яка

властива біосурфактантам мікробного походження. Крім того, ці штами характеризувалися стабільністю по продукції біоПАР.

У трьох продуцентів біоПАР – *B. subtilis* ІБ-17, *B. subtilis* ІБ-18 і *B. subtilis* ІБ-19 на середовищі, яке містить крохмаль було показано, що інтенсивне утворення поверхнево-активних речовин здійснюється в логарифмічній фазі росту бактерій, приблизно через 10 год від початку їх вирощування, і завершується до переходу в стаціонарну фазу. З переходом в стаціонарну фазу (через 24 год) концентрація біоПАР досягає свого максимуму. При припиненні вегетативного росту клітин і переході їх до формування спор подальших змін у величині поверхневого натягу не відбувається. Синтез поверхнево-активних речовин культурами бацил пов'язаний з інтенсивністю катаболічних процесів, що дозволяє, при розробці відповідних технологій, використовувати процеси безперервного культивування продуцентів [16].

Дослідження показують, що такі джерела вуглецю як крохмаль, гліцерин і глюкоза є ефективними при культивуванні продуцентів біоПАР серед бактерій роду *Bacillus*. Однак, скринінг продуцентів біосурфактантів слід проводити, використовуючи у якості субстрату крохмаль, оскільки більше число штамів здатне до синтезу біоПАР саме на цьому субстраті більшою мірою, ніж на гліцерині, і ще менше культур – на глюкозі. Крім того, використання крохмалю економічно доцільніше, ніж глюкози.

Для підвищення виходу сурфактину у процесах ферментації були запропоновані рішення, засновані на підборі складу поживних середовищ, зміні технологічних схем або на отриманні мутантних штамів вже відомого продуцента *B. subtilis* ATCC 21332.

Шляхом додавання у базове живильне середовище гідролізату торфу Sheppard J. and Mulligan C. домоглися виходу 0,16 г/л сурфактину, використовуючи відомий продуцент [14].

Cooper D.G. et al. [3], запропонували технологію отримання сурфактину за допомогою відомого штаму *B. subtilis* ATCC 21332, засновану на

безперервному відборі піни з ферментера. Реалізація даного рішення дозволила досягти виходу сурфактину 0,7-0,8 г/л.

Mulligan et al. [9] шляхом ультрафіолетового опромінення відомого продуцента *B. subtilis* ATCC 21332 отримали мутант *B. subtilis* ATCC 53813, який в 3,4 рази перевершує вихідний по продуктивності.

Carrera et al. [10, 11], використовуючи мутаген N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, отримали з відомого *B. subtilis* ATCC 21332 новий мутант *B. subtilis* ATCC 55033, що забезпечує вихід від 1,2 до 2,0 г/л сурфактину з чистотою 99 %.

Ohno et al. [7, 8] за допомогою рекомбінантної плазмиди pC112 отримали штам *Bacillus subtilis* MI 113, що перевершує за продуктивністю дикий штам в 1,5 рази. Однак накопичення сурфактину при глибинному культивуванні не перевищувало 0,4 г/л, але при твердофазній ферментації цього рекомбінантного штаму на середовищі з коагулятом сої «Okara» в якості субстрату продуктивність зростає до 2,0 г/кг сирової ваги середовища.

Основним недоліком відомих рекомбінантних штамів є недостатня стабільність плазмід, що несуть ген, який регулює біосинтез сурфактину. До інших недоліків слід віднести законодавчі обмеження на застосування генетично модифікованих мікроорганізмів у природних умовах і фармацевтиці, що мають місце у більшості розвинених країн.

У наукових публікаціях є дані про природні («дикі») штами *B. subtilis* S 499 (продуктивність 110 мг/л) і *B. subtilis* RB 14 (продуктивність 250 мг/л). Однак, їх недоліком є сопродукція антибіотика ітурину, який вкрай складно відокремити від цільового продукту [5].

Застосування біоПАР *Bacillus subtilis*

Мікроорганізми–продуценти ПАР набули здатності синтезувати антимікробні сполуки у процесі еволюції. Наприклад, рамноліпіди, манозилеритритолліпіди (МЕЛ) і сурфактини завдяки антибіотичній активності

забезпечують перевагу продуцентам у процесі колонізації нового середовища і конкуренції за субстрат з іншими видами. З біологічного погляду дослідження мікробних ПАР дозволяє детальніше зрозуміти таке явище у природі, як активний антагонізм. Яскравим прикладом є високий антимікробний потенціал нещодавно виділеного ліпопептиду *Brevibacillus brevis* НОВ1 проти штаму *Bacillus licheniformis*, ізольованого разом із продуцентом ПАР з відпрацьованої води нафтового поля.

Таблиця 1

Деякі поверхнево-активні речовини, що використовуються у медицині

Мікроорганізм-продуцент	Тип ПАР	Практичне застосування
1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> 20В	Ліпопептид	Антифунгальна активність проти фітопатогенних грибів
<i>Bacillus subtilis</i>	Сурфактин (ліпопептид)	Антибактеріальна й антифунгальна дія, гемолізіс та утворення іонних каналів у ліпідних мембранах, протипухлинна дія щодо ракових клітин Ерліха, широка противірусна активність
<i>Bacillus subtilis</i> 20В	Ліпопептид N1	Антибактеріальна дія на спорові мікроорганізми, стрептококи, стафілококи, збудників туберкульозу
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> BAS50	Ітурин (ліпопептид)	Вплив на морфологію і мембранні структури дріжджових клітин, антимікробна та антифунгальна дія, підвищення електричної провідності ліпідів мембран, нетоксичний і непірогенний імунологічний ад'ювант
	Пумілацидин (аналог сурфактину, ліпопептид)	Противірусна активність щодо простого вірусу герпесу 1 (HSV-1), інгібування H ⁺ , K ⁺ - АТФази та профілактика шлункових виразок <i>in vivo</i>
	Ліхенізін (ліпопептид)	Бактерицидна дія

Продовження Таблиці 1

1	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LP03	Бамілоцин А (ліпопептид)	Антифунгальна активність проти фітопатогенних грибів
<i>Bacillus circulans</i>	Ліпопептид	Антимікробна дія на широкий спектр мікроорганізмів, у тому числі резистентних <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Brevibacillus brevis</i> НОВ1	Ліпопептид	Антимікробна дія

Практичне застосування сурфактину можливе в нафтовидобувній промисловості для збільшення видобування нафти з нафтоносних пластів, при очищенні місткостей від залишків нафти, очищення забрудненої вуглеводнями ґрунту, для стабілізації і дестабілізації емульсій, а також в якості біологічно активного компонента фармпрепаратів.

Таким чином, аналіз літературних даних показує, що бактерії, які належать до роду *Bacillus*, можуть бути перспективними продуцентами біоПАР. Серед представників роду *Bacillus* найбільшим потенціалом утворення біоПАР володіють ізоляти виду *B. subtilis*. На теперішній час собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами за рахунок низького виходу цільового продукту та високих витрат на його виділення та очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу поживного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчатої схеми виділення ПАР може суттєво змінити існуючу ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умови використання нових мутантних, рекомбінантних та штамів-надсинтетиків ПАР.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Arima K. a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation / K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1968. – V.31. – P. 488–494.

2. Banat I.M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review / I.M. Banat // Bioresource Technol. – 1995. – Vol. 51. – P. 1–12.

3. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions / [Cooper D.G., MacDonald C.R., Duff S.F.B., Kosaric N.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – V.42. – P. 408–412.

4. Desai J.D. Microbial surfactants: evaluation, types, production and future applications / J.D. Desai // Journal of Scientific & Industrial Research. – 1987. – №10. – P. 440–449.

5. Штамм бактерий *B. subtilis* – продуцент сурфактина. – Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/227/2270858.html>

6. Neu R. Thomas, Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces / R. Neu // Microbiol Rev. – 1996. – Vol. 60(1) – P. 151–166.

7. Ohno A. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation / A. Ohno, T. Ano, M. Shoda // Biotechnol. Bioeng. – 1995. – V.47. – P. 209–214.

8. Ohno A. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis* / A. Ohno, A. Takashi, M. Shoda // Biotechnol. Lett. – 1992. – V.14. – P.1165–1168.

9. Pat. 5037758 USA, C12N 001/20 Enhanced production of biosurfactant through the use of a mutated *B. subtilis* strain. / Mulligan C.N., Chow T.Y. / Publ. August 6, 1991.

10. Pat. 5227294 USA, C12P 021/02; C12P 001/125 Method of producing surfactin with the use of mutant of *Bacillus subtilis*. / Carrera P., Cosmina P., Grandi G./ Publ. July 13, 1993.

11. Pat. 5264363 USA, C12R 001/125; C12P 021/04 Mutant of *Bacillus subtilis*. / Carrera P., Cosmina P., Grandi G./ Publ. November 23, 1993.

12. Perfumo A. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry / A. Perfumo, I. Rancich, I.M. Banat // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 672. – P. 135–145.
13. Rosenberg E. Surface active polymers of *Acinetobacter* / E. Rosenberg, E.Z. Ron // In *Biopolymers from Renewable Sources*, D Kaplan (ed.). – Berlin: Springer, 1998. – P. 281–291.
14. Sheppard J.D. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate / J.D. Sheppard, C.C.N. Mulligan // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1987. – V.27 – P. 110–116.
15. Van Hamme J.D. Recent advances in petroleum microbiology / J.D. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward // *Microbiol Mol. Biol. R.* – 2003. – Vol.6 – P. 503–549.
16. Яковлева О.В. Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Cohn – продуценты поверхностно-активных веществ: автореф. дис. на соиск. учен. степ. к.б.н.: спец. 03.00.07 / Яковлева Ольга Валерьевна; [Ин-т биологии Уфим. науч. центра РАН]. – Уфа: 2004. – 21 с.
17. Елисеев А. Особенности биосинтеза поверхностно-активных липидов культурой *Bacillus* sp. / А. Елисеев, А.П. Шульга, Е.В. Карпенко // *Микробиологический журнал.* – 1990. – № 3. – С. 41–44.
18. Кучер Р.В. Поверхностно-активные пептидолипиды культуры *Bacillus* sp. : / [Р.В. Кучер, А.Н. Шульга, С.А. Елисеев и др.] // *Докл. АН УССР (Сер. Б. геол., хим. и биол. Науки).* – 1990. – № 9. – С. 40–42.
19. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства / [О.Ю. Лесык, С.А. Елисеев, О.В. Полулях, Ю.В. Карпенко] // *Микробиол. журн.* – 1991. – Т. 53, №2. – С. 36–40.
20. Образование нефтewытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин (КНР) / [Т.Н. Назина, Д.Ш. Соколова, А.А. Григорьян и др.] // *Микробиология.* – 2003. – Т. 72. – С. 206–211.

21. Павленко Н.И. Эмульгирующая активность углеводородусваивающих микроорганизмов / Н.И. Павленко, Л.М. Хенкина, З.Т. Бега // Микробиологический журнал. – 1994. – № 1. – С. 90–91.

22. Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: Материалы Междунар. науч.- практ. конф., 2528 мая 2005 г., Минск-Нарочь / Сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенко. – Мн.: РИВШ, 2005. – С.140–141.

БИОСИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS*

О.В. ИВАНЬСЬКО

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Биосурфактанты (biosurfactants) – поверхностно-активные вещества (ПАВ) бактериального происхождения с выраженными мультифункциональными свойствами. В статье представлены данные литературы о способности представителей рода *Bacillus* к образованию поверхностно-активных веществ и практического использования в промышленности, биологии и медицине. Рассмотрены характеристики липопептидов, синтезированных представителями рода *Bacillus*.*

Ключевые слова: *биосурфактанты, *Bacillus*, липопептиды, сурфактин, условия культивирования*

BIOSYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE COMPOUNDS BY BACILLUS GENUS BACTERIA

O.V. IVANYSKO

National Aviation University, Kyiv

Biosurfactants – surface-active agents (surfactants) of bacterial origin with pronounced multifunctional properties. In this article presents the data in the literature about the ability of representatives of the genus Bacillus to the formation of surfactants and practical use in industry, biology and medicine. The characteristics of lipopeptide synthesized by representatives of the genus Bacillus.

Keywords: *biosurfactants, Bacillus, lipopeptides, surfactin, culture condition*