

**ШЛЯХИ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІЦЕРИНУ У ПРОДУЦЕНТІВ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS*
ERYTHROPOLIS ІМВ Ас-5017, *ACINETOBACTER*
CALCOACETICUS ІМВ В-7241 ТА *NOCARDIA VACCINII* К-8**

Машенко О.Ю., Шулякова М.О

Анотація. Встановлено, що у продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *Nocardia vacciniі* К-8 катаболізм гліцерину до дигідроксиацетонфосфату може здійснюватись двома шляхами: через гліцерин-3-фосфат і через дигідроксиацетон. Окиснення гліцерину у штамів ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017 та К-8 каталізується двома ферментами: ПХХ-залежною гліцериндегідрогеназою та НДМА-залежною алкогольдегідрогеназою. Отримані дані є вихідними для вдосконалення технологій мікробного синтезу.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, метаболізм гліцерин, активність ферментів, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Nocardia vacciniі* К-8.

Вступ. Надшвидке збільшення обсягів виробництва біодизелю створило надлишок технічного гліцерину (побічного продукту трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів), що в свою чергу призвело до зниження ціни на цей продукт в 10 разів тільки за останні роки та необхідності його утилізації. Одним із альтернативних шляхів вирішення цієї проблеми є використання гліцерину в технологіях мікробного синтезу практично цінних продуктів, у тому числі й для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) [1]. Унікальні властивості мікробних ПАР дають змогу використовувати їх у різних галузях промисловості та природоохоронних біотехнологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків [2].

Методи досліджень. Як об'єкти досліджень використовували ізольовані з забрудненого нафтою ґрунту бактеріальні штами *Nocardia vacciniі* К-8 та *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 і *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, штами К-4 і ЕК-1 депоновані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ В-7241 та ІМВ Ас-5017.

Культивування *N. vacciniі* К-8 проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5% , і $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001г/л.

R. erythropolis ІМВ Ас-5017 культивували на рідкому мінеральному середовищі наступного складу(г/л): NaNO_3 – 1,3; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; рН 6,8–7,0.

A. calcoaceticus ІМВ В-7241 культивували на середовищі такого ж складу як і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за виключенням джерела азоту: замість NaNO_3 в середовище вносили $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ в концентрації 0,3 г/л. Крім того в середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка).

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин – 1,0 – 1,5% (об'ємна частка).

Посівний матеріал – культура з середини експоненційної фази росту (48-60 год), вирощений на середовищах наведеного вище складу з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину. Кількість інокуляту – 5 % від об'єму засіяного середовища (10^4 – 10^5 клітин/мл). Культивування бактерій здійснювалося в колбах об'ємом 750 з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30°C упродовж 24 – 48 год.

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та *N. vaccinii* K-8 на рідкому мінеральному середовищі, центрифугували (5000 г, 10 хв, 4°C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (5000 г, 10 хв, 4°C). Відмиті клітини, ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) та руйнували ультразвуком (22 кГц) за допомогою апарату УЗДН-1. Отриманий дезінтеграт центрифугували (11000 г, 15 хв), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність піролохінолінхінон (ПХХ)-залежної алкогольдегідрогенази (КФ.1.1.2.8) та ПХХ-залежної гліцериндегідрогенази (КФ 1.1.99.22) визначали по відновленню дихлофеноліндофенолу в присутності фенозинметасульфату при довжині хвилі E_{600} .

Активність нікотинпротеїнової (НАД(Ф)Н- залежної) алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.99.36) визначали спектрофотометрично по відновленню 4-нітрузо-N,N-диметиланіліну (НДМА) при 440 нм з гліцерином як донором електронів.

Активність НАД⁺-залежної гліцериндегідрогенази (КФ 1.1.1.6) визначали за відновленням НАД⁺ до дигідроксиацетону спектрофотометрично при 340 нм.

Активність гліцеринкінази (КФ 2.7.1.30), гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.8) та дигідроксиацетонкінази (КФ 2.7.1.29) досліджували спектрофотометрично при 340 нм за окисленням НАДН⁺. Активність флавінаденіндинуклеотид (ФАД)-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.5.3) визначали по відновленню 3-(4,5-диметилтриазоліл-2-)-2,5-дифенілтетразолій броміду в присутності фенозинметасульфату при 570нм з гліцерин-3-фосфатом як донором електронів.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1), глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31) визначали, як описано раніше [9].

Активність ферментів в безклітинних екстрактах визначали при температурі 28-30°C оптимальній для росту даних бактерій, виражали у $\text{нмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка. Вміст білка в безклітинних екстрактах визначали за Bradford.

Всі дослідження проводили в 3 повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах складало від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Г.Ф. Лакінім. Достовірність результатів дослідження оцінювали згідно з критеріями Стьюдента при 5% рівні значущості.

Результати та обговорення. Раніше нами було показано принципову можливість інтенсифікації синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Nocardia vaccinii* K-8 за використання суміші гліцерину та гексадекану як джерела вуглецю і енергії. Проте для забезпечення максимальної конверсії вуглецю в цільовий продукт необхідне встановлення оптимального для його синтезу молярного співвідношення концентрацій моносубстратів в суміші, що в свою чергу вимагає проведення теоретичних розрахунків

енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси з наступним визначенням концентрації додаткового субстрату. Оскільки для здійснення таких розрахунків необхідно знати шляхи метаболізму відповідних монособстратів, метою даної роботи було дослідження особливостей метаболізму гліцерину у продуцентів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *N. vaccinii* К-8.

У мікроорганізмів, що використовують гліцерин як джерело енергії, цей субстрат асимілюється двома шляхами [3]. Перший шлях починається з АТФ-залежного фосфорилування гліцерину, що каталізується гліцеринкіназою, з утворенням гліцерин-3-фосфату, який в подальшому окиснюється до дигідроксиацетонфосфату за участю гліцерин-3-фосфатдегідрогеназ або гліцерин-3-фосфатоксидаз (гліцерин-3-фосфатний шлях). Другий шлях катаболізму починається окисненням гліцерину до дигідроксиацетону гліцериндегідрогеназами (нікотинамідаденіндинуклеотид- (НАД⁺) або піролохінолінхінон (ПХХ)-залежними). Дигідроксиацетон, що утворився, далі фосфорилується до дигідроксиацетонфосфату за участю дигідроксиацетонкінази (дигідроксиацетонівий шлях).

Дигідроксиацетонфосфат є інтермедіатом гліколізу і далі метаболізується за цим шляхом.

У безклітинних екстрактах *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *N. vaccinii* К-8 не виявлено НАД⁺-залежної гліцериндегідрогеназної активності, проте було виявлено активність ПХХ-залежної гліцериндегідрогенази. Оскільки в попередніх дослідженнях [4] було встановлено широку субстратну специфічність нітрузо-N,N-диметиланілін(НДМА)-залежних алкогольдегідрогеназ *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *R. erythropolis*, на наступному етапі досліджували роль цих ферментів у окисненні гліцерину досліджуваними штамми. У результаті проведених аналізів було встановлено, що окиснення гліцерину у штамів ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017 та К-8 каталізується двома ферментами: ПХХ-залежною гліцериндегідрогеназою та НДМА-залежною алкогольдегідрогеназою (табл. 1).

Таблиця 1. Активність ферментів шляхів катаболізму гліцерину у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *N. vaccinii* К-8

Шлях катаболізму гліцерину	Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)		
		ІМВ В-7241	ІМВ Ас-5017	К-8
Дигідроксиацетонівий	ПХХ-залежна гліцериндегідрогеназа	107,5±5	94,5±4	256±13
	НДМА-залежна алкогольдегідрогеназа	32±1,6	24±1,2	550±28
	Дигідроксиацетонкіназа	336±16	288±14	732±37
Гліцерин-3-фосфатний	Гліцеринкіназа	780±39	800±40	244±12
	НАД ⁺ -залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа	159±8	108±5	488±24

Аналіз активності ферментів гліцерин-3-фосфатного шляху катаболізму гліцерину виявив у всіх трьох штамів досить високі активності гліцеринкінази і НАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази, проте активність ФАД⁺-залежної вставлено не було (табл. 1).

У табл. 2 наведені дані про активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- (глутаматдегідрогеназа) і гліколіпідів (фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилаза, ФЕП-синтаза), а також анаплеротичних реакцій (ізоцитратліаза і ФЕП-карбоксилаза) при культивуванні штамів ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017 і К-8 на середовищі з гліцерином. Значимо, що в таких умовах культивування у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* К-8 гліоксилатний цикл не функціонує (не виявлена активність ізоцитратліази), а поповнення пулу С₄-дикарбонових кислот відбувається у ФЕП-карбоксилазній реакції. На відміну від двох інших штамів, у *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 хоч і виявлено невисоку активність ізоцитратліази, активність цього ферменту була на порядки нижче, ніж ФЕП-карбоксилазна активність (табл. 2).

Таблиця 2

Активність ферментів біосинтезу ПАР під час росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *N. vaccinii* К-8 на гліцерині

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)		
	ІМВ В-7241	ІМВ Ас-5017	К-8
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	597±30	Н. в.	329±16
Ізоцитратліаза	0	44±2	0
ФЕП-карбоксилаза	1045±52	2727±136	656±33
ФЕП-синтаза	1780±89	2428±121	23667±1183
ФЕП-карбоксикіназа	448±22	909±45	820±41

Примітка: Н.в. – «не визначали»

Очевидно, що при рості штаму ІМВ Ас-5017 на гліцерині основною анаплеротичною реакцією також є реакція, що каталізується ФЕП-карбоксилазою. Виявлена досить висока активність ключових ферментів глюконеогенезу свідчить про біосинтез із гліцерину гліколіпідів усіма трьома штамми, а активність глутаматдегідрогенази – про утворення штамми ІМВ В-7241 і К-8 ще й поверхнево-активних аміноліпідів. З отриманих даних можна зробити висновок, що основні компоненти утворених ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 під час росту на гліцерині не відрізняються від складу ПАР, отриманих після культивування штамів на етанолі [5].

Висновки. Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що у штамів ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017 та К-8 катаболізм гліцерину до дигідроксиацетонфосфату може здійснюватись обома відомими шляхами. Отримані дані є вихідними для проведення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на цьому субстраті та визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів для підвищення синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *N. vaccinii* К-8 на їх суміші.

Науковий керівник: д.б.н., проф. Пирог Т.П.

Література.

1. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. - 2009. - V. 27, № 1. - P. 30-39.

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. – V.87, №2. – P. 427–444.

3. Bizzini A., Zhao C., Budin-Verneuil A., Sauvageot N., Giard J.C., Auffray Y., Hartke A. Glycerol is metabolized in a complex and strain-dependent manner in *Enterococcus faecalis* // *J. Bacteriol.* – 2010. – V.192, № 3. – P. 779–785.

4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Глицерин как субстрат для синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // *Мікробіол. журнал.* – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.

5. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2009. – V.45, №3. – P. 272–278.

6. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // *Микробиология.* – 2008. – 77, № 6. – С. 749–757.

Авторська довідка.

1. **Маценко Оксана Юрївна**, студентка 4 курсу, кафедра біотехнології та мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: maschchencooksa@gmail.com

2. **Шулякова Марія Олександрівна**, магістрант, кафедра біотехнології та мікробіології, Національний університет харчових технологій, e-mail: mariejanvier@rambler.ru