

РОЛЬ ФОСФОЕНОЛПІРУВАТКАРБОКСИЛАЗИ У СИНТЕЗИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER* *CALCOACETICUS* K-4

Встановлено, що під час культивування *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною показники синтезу поверхнево-активних речовин, активність фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилази (ферменту анаплеротичної реакції, що функціонує у мікроорганізмі за умов росту на вуглеводних субстратах), а також ферментів гліконеогенезу (ФЕП-синтази і ФЕП-карбоксикінази) були у 1,5–3 рази вищими порівняно з використанням нітратного джерела азотного живлення.

Обговорюється фізіологічна роль ФЕП-карбоксилази у процесі вирощування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з етанолом і сечовиною як спосіб знешкодження вуглекислого газу, утвореного в уреазній реакції, що в свою чергу супроводжується підвищенням у клітинах бактерій пулу C_4 -дикарбонних кислот, посиленням гліконеогенезу і збільшенням синтезу поверхнево-активних гліколіпідів.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, поверхнево-активні речовини, етанол, сечовина, фосфоенолпіруваткарбоксилаза, анаплеротичні реакції, гліконеогенез.

Штам *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, за умов росту на етанолі синтезує поверхнево-активні речовини (ПАР), які за хімічною природою є комплексом гліко-, аміно і нейтральних ліпідів [5, 7]. Попередні дослідження були спрямовані на встановлення умов культивування продуцента, що забезпечують максимальні показники синтезу ПАР, визначення можливого практичного використання препаратів ПАР *A. calcoaceticus* K-4 для очищення довкілля від нафти та продуктів її переробки [7, 9, 10].

Дослідження особливостей C_2 -метаболізму *A. calcoaceticus* K-4 [11] показало наявність у штаму ферментів, не характерних для представників роду *Acinetobacter*. До таких ферментів належать насамперед 4-нітрузо-*N,N*-диметиланілін-залежні алкоголь- і ацетальдегіддегідрогенази, піролохінолінхінон-залежна ацетальдегіддегідрогеназа, АТФ-залежна фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксикіназа і трегалозофосфатсинтаза. Виявилось несподіваним, що у процесі культивування *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі, незважаючи на наявність ферментів гліоксилатного циклу, у клітинах бактерій було виявлено достатньо високу (1600 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білку) активність ФЕП-карбоксилази – ферменту анаплеротичного шляху, що забезпечує поповнення пулу C_4 -дикарбонних кислот за умов росту мікроорганізмів на вуглеводних субстратах.

У наших попередніх працях [4, 6] було показано, що під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 – продуцента екзополісахариду етаполану на етанолі і суміші ростових C_2 – C_6 -субстратів спостерігається висока активність як ферментів гліоксилатного циклу, так піруваткарбоксилази. Зазначимо, що у процесі росту на вуглеводах піруваткарбоксилаза каталізує анаплеротичну реакцію утворення оксалоацетату з пірувату, яка є незворотною [18]. До теперішнього часу в літературі є лише кілька повідомлень про здатність піруваткарбоксилази здійснювати декарбоксилювання оксалоацетату [13, 21]. Цілком ймовірно, що за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на C_2 -субстратах піруваткарбоксилаза може брати участь в утворенні пірувату (наряду з оксалоацетатдекарбоксилазною реакцією).

Активність піруват- і ФЕП-карбоксилази реєстрували під час росту *Corynebacterium glutamicum* на ацетаті [22], проте фізіологічна роль цих ферментів у разі вирощування корінебактерій на C_2 -субстраті залишається невідомою.

Мета даної роботи – визначення ролі ФЕП-карбоксилази для росту і синтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі.

Матеріали і методи. Штам *A. calcoaceticus* K-4 депонований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером ІМВ В-7241.

A. calcoaceticus K-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі Мюнца [3] (г/л): KNO_3 – 1,0; $NaCl$ – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1, рН 6,8–7,0. В одно-

му з варіантів нітрат калію у середовищі було замінено на еквімолярні за азотом концентрації NaNO_3 ; NH_4Cl ; NH_4NO_3 і $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Як джерело вуглецю і енергії використовували етано. концентрації 1–2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з седини експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 етанолу. Кількість інокуляту – 5 % від об'єму середовища (10^4 – 10^5 клітин/мл). Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °C упродовж 48–120 год.

Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху вагу клітин за калібрувальним графіком. Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР*), індекс емульгування (E_{24}) розбавленої у 50 разів культуральної рідини, які визначали як описано раніше [7].

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* K-4 на рідкому середовищі з етанолом, центрифугували (5000 г, 20 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 г, 15 хв, 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 г, 30 хв, 4 °C), осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1), ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31), ФЕП-синтези (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) визначали як описано у праці [11]. Під час дослідження впливу катіонів калію, натрію і амонію на активність ізоцитратліази і ФЕП-карбоксилази відмивання клітин, ультразвукову обробку і визначення активності ферментів здійснювали у 0,05 М трис-фосфатному буфері (рН 7,0). Концентрація катіонів у реакційній суміші становила 25, 50 і 100 мМ. Катіони вносили у реакційну суміш у вигляді 20 %-вих розчинів KCl , NaCl і NH_4Cl .

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерхунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [16].

Активність ферментів аналізували при 28–30 °C – температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* K-4.

Всі досліді проводили у трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від трьох до п'яти. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали як описано у роботі [2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У попередніх дослідженнях з оптимізації умов культивування *A. calcoaceticus* K-4 було встановлено, що найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися за використанням як джерела азоту сечовини [7]. Тому на першому етапі аналізували активність ферментів анаплеротичних шляхів за умов росту штаму K-4 на вихідному середовищі Мюнца і модифікованому нами середовищі, в якому нітрат калію було замінено на еквімолярну за азотом концентрацію сечовини (табл. 1). Як видно з наведених у табл. 1 даних, активність ізоцитратліази (ключового ферменту гліюксилатного циклу) залишалася практично на одному й тому самому рівні незалежно від природи джерела азотного живлення у середовищі культивування *A. calcoaceticus* K-4, у той час як активність ФЕП-карбоксилази підвищувалася у 2,5 рази за умов росту штаму K-4 на середовищі з сечовиною. Зазначимо, що збільшення активності ФЕП-карбоксилази корелювало з підвищенням показників синтезу ПАР (табл. 1). Так, під час культивування штаму K-4 на модифікованому нами середовищі умовна концентрація ПАР була у 2, а індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини – у 1,5 рази вищими порівняно з вирощуванням бактерій на вихідному середовищі Мюнца.

Ми припустили, що однією з причин зниження активності ФЕП-карбоксилази у процесі культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з KNO_3 може бути інгібування активності цього ферменту катіонами калію. У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували вплив одновалентних катіонів на активність ФЕП-карбоксилази та ізоцитратліази (табл. 2). Одержані експериментальні результати не підтвердили нашого припущення: за присутності до

ROLE OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE IN SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4

Summary

It has been established that under cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* K4 on the medium with ethanol and urea the indices of surfactants synthesis, activity of phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (enzyme anaplerotic reaction functioning in microorganisms under growth on carbohydrate substrates), as well as enzymes of gluconeogenesis (PEP-synthetase and PEP carboxykinase) were 1,5-3 times higher as compared with the use of nitrate source of nitrogen nutrition.

Physiological part of PEP-carboxylase when growing *A. calcoaceticus* K-4 on the medium with ethanol and urea as a method of neutralization of carbon dioxide by increasing a pool of C_4 -dicarbonic acids in the bacterial cells, by intensification of gluconeogenesis and synthesis of surface-active glycolipids.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, biosurfactants, ethanol, urea, phosphoenolpyruvate carboxylase, anaplerotic reactions, gluconeogenesis.

The author's address: Pirog T.P., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Готтшиалк Г. Метаболизм бактерий. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 303 с.
4. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 растущего на этаноле // Микробиология. – 2003. – 72, № 4. – С. 459–465.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С. 58–63.
6. Пирог Т.П., Лащук Н.В., Корж Ю.В. Регуляція C_2 -метаболізму в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші етанолу і глюкози // Мікробіол. журнал. – 2006. – 68, № 1. – С. 21–32.
7. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – 45, № 3. – С. 304–310.
8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.О. Особливості окиснення алканів у *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. – 2009. – 71, № 4. – С. 9–13.
9. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокіна А.І. Вплив поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на ефективність мікробної деструкції нафтових забруднень // Мікробіол. журнал. – 2009. – 71, № 5. – С. 8–13.
10. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокіна А.І. Біодеструкція поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Мікробіол. журнал. – 2010. – 72, № 1. – С. 28–33.
11. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугінець О.С. Особливості окиснення етанолу у *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 – продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. – 2010. – 72, № 6. – С. 3–10.
12. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дривса, Г. Шлегеля. – Т. 1. – М.: Мир, 2005. – 654 с.
13. Atwood P.V., Cleland W.W. Decarboxylation of oxaloacetate by pyruvate carboxylase // Biochemistry. – 1976. – 15, N 25. – P. 8191–8196.
14. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69, N 5. – P. 2608–2615.
15. Belzer C., Stoof J., Beckwith C.S., Kuipers E. J., Kusters J.G., van Vliet A.H. Differential regulation of urease activity in *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* // Microbiology. – 2005. – 151, N 12. – P. 3988–3995.
16. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72, N 1–2. – P.248–254.
17. Geweely N.S.I. Purification and characterization of intracellular urease enzyme isolated from *Rhizopus oryzae*