

УДК 579.841:577.114

Корж Ю.В., Пирог Т.П.

ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ СИНТЕЗУ МІКРОБНОГО ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА С₂-СУБСТРАТАХ

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

Показано, що „вузьким” місцем метаболізму етанолу у *Acinetobacter* sp. В-7005 є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою, є швидкість-лімітуючою. На основі досліджень регуляції С₂- метаболізму встановлені умови культивування бактерій, що дають змогу підвищити в 3 рази активність ацетил-КоА-синтетази, усунути лімітування метаболізму С₂-сполук і розробити нову технологію одержання етаполану з заданими фізико-хімічними властивостями.

Ключові слова: регуляція, С₂-метаболізм, екзополісахариди, фізико-хімічні властивості

Вступ. Штам бактерій *Acinetobacter* sp. В-7005 є продуцентом комплексного полісахаридного препарату (ЕПС) етаполану [1]. У попередні роки нами була розроблена технологія отримання етаполану на основі етанолу, розроблені підходи до інтенсифікації синтезу ЕПС, управління його складом і фізико-хімічними властивостями [1, 2]. Проте ці дослідження базувались лише на теоретичному аналізі можливих метаболічних шляхів синтезу етаполану. Відомо, що в послідовності метаболічних реакцій, що приводять до синтезу ключових інтермедіатів – попередників утворення ЕПС може бути „вузьке” місце – реакція, швидкість якої нижче від інших, або пов’язана з великими затратами енергії чи втратою вуглецю субстрату. У зв’язку з цим мета даної роботи полягала у дослідженні основних етапів С₂-метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005, виявленню „вузьких” місць і розробці підходів до їх усунення.

Об’єкт та методи. Культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 здійснювали на мінеральному середовищі Кодама в колбах на качалці (220 об/хв) при 30°C, рН 6,8-7,0 впродовж 96 год. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол в

концентрації 0,5 і 1,0% (за об'ємом), етанол 1% і ацетат калію 0,01 і/або 0,1%. Концентрацію біомаси і ЕПС визначали ваговим методом. Визначення активності ключових ферментів C_2 -метаболізму, ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) і деяких біосинтетичних шляхів (зокрема, глюконеогенезу) здійснювали в безклітинних екстрактах, як описано у роботі [3]. Етаполан виділяли з культуральної рідини осадженням ізопропанолом після попереднього відокремлення клітин продуцента та діалізу. Властивості розчинів етаполану оцінювали за зміненням їх в'язкості в присутності 0,1 М КСІ, при рН 4-4,5 (за умови переведення ЕПС в H^+ -форму), в системі Cu^{2+} - гліцин. Розділення етаполану на ацильовані (АП) і неацильовані (НАП) компоненти здійснювали за розробленим нами методом, як описано в роботі [4].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що окиснення етанолу до ацетальдегіду у бактерій здійснюється НАД⁺-залежною алкогольдегідрогеназою. Акцепторами електронів в ацетальдегіддегідрогеназній реакції є НАД⁺ і НАДФ⁺. Залучення ацетату до метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 відбувається за участю ацетил-КоА-синтетази. Анаплеротичною послідовністю реакцій, що поповнюють пул C_4 -дикарбонових кислот у клітинах штаму, є гліюксилатний цикл, про що свідчила наявність ізоцитратліази і малатсинтази. Незважаючи на функціонування гліюксилатного циклу, в клітинах *Acinetobacter* sp. В-7005 виявлена висока активність ферментів ЦТК (табл. 1), який виконує переважно біосинтетичну роль. Про це свідчила висока активність ізоцитратдегідрогенази, глутаматдегідрогенази і значно нижча активність 2-оксоглутаратдегідрогенази. При рості бактерій на етанолі утворення пірувату відбувається в оксалоацетатдекарбоксилазній реакції, а синтез фосфоенолпірувату (ФЕП) забезпечується двома ключовими ферментами глюконеогенезу – ФЕП-карбоксикіназою і ФЕП-синтетазою.

Встановлено, що „вузьким” місцем метаболізму етанолу у *Acinetobacter* sp. В-7005 є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою, є швидкість-лімітуючою.

Отже, у клітинах бактерій *Acinetobacter* sp. B-7005, що ростуть на етанолі, ацетат утворюється з вищою швидкістю, ніж залучається до подальшого метаболізму.

Наступні дослідження були направлені на пошук факторів, що забезпечують однакову швидкість утворення і подальшого метаболізму ацетату в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005, вирощених на етанолі. Встановлено, що інгібіторами ацетил-КоА-синтетази є іони натрію, а також продукти окиснення етанолу й ацетальдегіду – НАДН і НАДФН. Активаторами ферменту є пантотенова кислота, катіони калію й магнію. Показано, що зниження початкової концентрації етанолу з 1,0 до 0,5% (з подальшим внесенням 0,5% етанолу у середині експоненційної фази росту), відсутність іонів натрію і наявність 100 мМ K^+ у середовищі культивування продуцента етанолу забезпечують практично однакову швидкість окиснення етанолу, ацетальдегіду і ацетату в інтактних клітинах бактерій, при цьому у три рази підвищується активність ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті. Це дало змогу реалізувати процес синтезу етанолу на середовищі, буферна ємність якого знижена в 2 рази. Отримання аналогічного результату при початковій концентрації етанолу 1,0% забезпечувалось (на фоні відсутності солей натрію і наявності 100 мМ K^+) при підвищенні концентрації пантотенової кислоти і Mg^{2+} в середовищі до 0,0009-0,0012% і 5 мМ відповідно. Однак при подальшому зниженні концентрації солей і буферної ємності середовища спостерігали зниження синтезу етанолу і накопичення ацетату в культуральній рідині. У таких умовах культивування продуценту етанолу активність ацетил-КоА-синтетази була у два рази нижчою.

З літератури відомо, що регуляція метаболізму може здійснюватися на двох рівнях: на рівні зміни активності і синтезу ферментів [5]. Літературні дані свідчать про те, що ацетил-КоА-синтетаза, яка функціонує в клітинах багатьох про-і еукаріот, є індукційним ферментом [6 - 8], індуктором синтезу якого є ацетат [9].

Наступні експерименти показали, що внесення в середовище з етанолом екзогенного ацетату дає змогу

підвищити активність ацетил-КоА-синтетази в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005. Додавання 0,1% ацетату калію в середовище з етанолом при отриманні посівного матеріалу і культивуванні бактерій дозволило усунути лімітування C₂-метаболізму і реалізувати процес синтезу етаполану на незабуференому середовищі з низьким вмістом солей.

На заключному етапі досліджували фізико-хімічні властивості етаполану, синтезованого на середовищах різного складу. Встановлено, що незалежно від умов культивування продуцента, сумарні ЕПС та виділені з них АП і НАП характеризувались практично однаковим вмістом вуглеводів (38,7 - 44,5%), піровиноградної кислоти (3,2 - 3,7%), були ідентичні за моносахаридним складом (глюкоза, маноза, галактоза, рамноза у співвідношенні 3:2:1:1), однак різнилися за вмістом мінеральних компонентів (6 - 28%), уронових (3,65 - 22%) і жирних кислот (5,8 - 15,9%), а також за співвідношенням АП і НАП. При культивуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 на середовищі 1 і 2 синтезувались високоацильовані полісахариди зі ступенем ацилювання до 15%. У складі таких ЕПС були відсутні неацильовані компоненти, а молекулярна маса становила 1,4 - 1,5 млн. і не змінювалася після осадження і висушування ЕПС.

Підвищений вміст жирних кислот і висока молекулярна маса етаполану, синтезованого на середовищах 1 і 2, зумовили збільшення в'язкості його розчинів у присутності одновалентних катіонів і в системі Cu²⁺-гліцин у порівнянні з ЕПС, одержаними на вихідному середовищі.

Висновки. На основі отриманих даних реалізовано процес синтезу етаполану на середовищі, в якому буферна ємність і загальний вміст солей були знижені в 4 рази, що дало змогу суттєво знизити собівартість кінцевого продукту. Етаполан, синтезований у таких умовах, характеризувався сукупністю всіх необхідних реологічних властивостей, що зумовлюють його практичне значення.

Література

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. - 212 с.
2. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* – Дисс..... докт. биол. наук. - Киев, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999. – 450 с.
3. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter sp.*, растущего на этаноле // Микробиология. - 2003. - Т.72, №4. - С. 459-465.
4. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.*, на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. - 1994. - 63, N 5. - С. 840-846.
5. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. - 310 с.
6. Brasen C., Schonheit P. Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea // Arch. Microbiol. - 2001. - V. 175, N 5.- P. 360-368.
7. De Virgilio C., Burckert N., Barth G., Neuhaus J.M., Boller T., Wiemken A.. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. - 1992. - V. 8, N 12. - P. 1043-1051.
8. Maconochie M.K., Connerton I.F., Casselton L.A. The *acu-1* gene of *Coprinus cinereus* is a regulatory gene required for induction of acetate utilisation enzymes // Mol.Gen.Genet. - 1992. - V. 234, N 2. - P. 211-216.
9. Kumari S., Tishet R., Eisenbach M., Wolfe A.J. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // J.Bacteriol. - 1995. - V. 177, N 10. - P. 2878-2886.

Таблиця 1

**Активність ферментів центрального метаболізму при
культивуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 на етанолі**

Фермент	Активність, нмоль/(хв мг білка)
1	2
НАД ⁺ -залежна алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.1.1.)	315,3
НАДФ ⁺ -залежна ацетальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.4.)	234,7
Ацетил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.1.)	95 (130,9)
Ацетаткіназа (КФ 2.7.2.1.)	21,6
Ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1.)	312, 2
Малатсинтаза (КФ 4.1.3.2.)	141,2
Цитратсинтаза (КФ 4.1.3.7.)	405,6
Аконітаза (КФ 4.2.1.3.)	349,0
НАД ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.41.)	0
НАДФ ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42.)	717,8
2-Оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2.)	93,4
Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.99.1.)	197,5
Фумараза (КФ 4.2.1.2.)	186,8
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37.)	643,1
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.82)	79,8
НАД ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.2.)	642,6
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.4.)	257,2
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилююча) (КФ 1.1.1.38.)	17,9
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилююча) (КФ 1.1.1.40.)	0
Оксалоацетатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.3.)	446,6
Піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1.)	160,6
Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49.)	48,7
Фосфоенолпіруватсинтетаза (КФ 2.7.9.1)	487,0

Примітки: Бактерії вирощували до середини експоненційної фази росту (16-18 год). Визначення активності всіх ферментів проводили в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,0). У дужках вказана активність ацетил-КоА-синтетази, яку визначали в 0,05 М К⁺-фосфатному буфері (рН 7,0).