

PECULIARITIES OF CENTRAL METABOLISM IN *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 AS A PRODUCER OF BIOSURFACTANTS

T. Pirog, T. Shevchuk, K. Beregova, N. Kudrya
National University of Food Technologies

Key words:

Nocardia vaccinii IMV B-7405

Central metabolism

Anaplerotic reactions

Activity of enzymes

Carbohydrate and non-carbohydrate substrates

Article history:

Received 03.08.2014

Received in revised form 17.08.2014

Accepted 26.08.2014

Corresponding author:

T. Pirog

E-mail:

tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

The activity of the enzymes of tricarboxylic acid cycle (TCA) and anaplerotic and some biosynthetic pathways in producing surfactants *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 grown on a carbohydrate (glucose) and non-carbohydrate (glycerol) substrates was studied. In the cells of the strain IMV B-7405 grown on both glucose and glycerol NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity (6 ± 128 and 328 ± 16 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein, respectively), and the activity of NAD⁺- and NADP⁺-dependent malate dehydrogenase (300 — 1600 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein) was detected. The absence in *N. vaccinii* of IMV B-7405 2-oxoglutarate activity may indicate the operation in this strain of alternative ways involving 2-oxoglutarate in the TCA cycle. Filling up the pool of the C₄-dicarboxylic acids in *N. vaccinii* IMV B-7405 occurs in the phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase reaction (650 — 1200 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein). High activity of both key enzymes of gluconeogenesis (PEP carboxykinase and PEP synthase, 800 — 2400 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein) and NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (300 — 1900 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein) confirmed the ability of IMV B-7405 strain to synthesis of surface active glyco- and aminolipids respectively. The obtained data are the basis for theoretical calculations of optimal molar ratio of unequal energy substrates concentrations to enhance the surfactants synthesis under *N. vaccinii* IMV B-7405 cultivation on their mixture.

ОСОБЛИВОСТІ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ *NOCARDIA VACCINII* ІМВ B-7405 — ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Х.А. Берегова, Н.В. Кудря
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено активність ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК), анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ B-7405 за умов росту на

вуглеводних (глюкоза) і неуглеводних (гліцерин) субстратах. У клітинах штаму ІМВ В-7405, вирощеного як на глюкозі, так і на гліцерині, виявлено НАДФ⁺-залежну ізоцитратдегідрогеназну активність (128 ± 6 і 328 ± 16 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка відповідно), а також активність НАД⁺- і НАДФ⁺-залежних малатдегідрогеназ (300 — 1600 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка). Відсутність у *N. vaccinii* ІМВ В-7405 активності 2-оксоглутаратдегідрогенази може свідчити про функціонування у цього штаму альтернативних шляхів залучення 2-оксоглутарату до ЦТК. Поповнення пулу C₄-дикарбонових кислот у штаму ІМВ В-7405 відбувається у фосфенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазній реакції (650 — 1200 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка). Висока активність обох ключових ферментів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикинази і ФЕП-синтетази, 800 — 2400 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) і НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (300 — 1900 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) підтвердила здатність штаму ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів. Одержані дані є основою для проведення теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів для підвищення синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на їх суміші.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, центральний метаболізм, анаплеротичні реакції, активність ферментів, вуглеводні і неуглеводні субстрати.

На даний час у світі спостерігається підвищений інтерес до застосування мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) у різних галузях промисловості, що зумовлено їхньою екологічною безпечністю та високою ефективністю [1—4]. Проте, незважаючи на очевидні переваги мікробних ПАР, перед синтетичними аналогами існують проблеми, пов'язані з впровадженням їх промислового виробництва. У зв'язку з цим дослідження останнього десятиліття фокусуються на визначенні підходів до здешевлення технологій мікробних ПАР [5, 6]. Згідно із [5], факторами, які лімітують використання ПАР мікробного походження у промислових масштабах, є висока вартість субстратів для їхнього синтезу, невисокий вихід продукту, а також утворення суміші сполук, а не однієї чистої поверхнево-активної речовини. Дані фактори, а також інші тонкощі біотехнологічного виробництва ПАР (наприклад, необхідність додавання піногасника, вартісне обладнання тощо) зумовлюють високу вартість кінцевого продукту.

Одним із шляхів інтенсифікації технологій мікробного синтезу практично важливих метаболітів є використання для їх одержання змішаних енергетично нерівноцінних ростових субстратів [7].

Наші попередні дослідження показали можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол, глюкоза) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 [8]. Встановлено, що максимальні значення умовної концентрації ПАР (4,8) спостерігалися за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші глюкози з гліцерином.

Проте для забезпечення максимальної конверсії вуглецю в цільовий продукт необхідне встановлення оптимального для його синтезу молярного

співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші, як було встановлено нами раніше для мікробного екзополісахариду етаполану [7] і поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [9, 10]. Це потребує попереднього здійснення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті з подальшим визначенням концентрації енергетично надлишкового субстрату, що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес. Для проведення таких теоретичних розрахунків необхідно знати шляхи метаболізму конкретних моносубстратів у мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних речовин.

Мета: дослідження активності ключових ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК), анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у *N. vaccinii* IMB B-7405 за умов росту на вуглеводних (глюкоза) і неуглеводних (гліцерин) субстратах.

Основний об'єкт досліджень ізольований нами із забрудненого нафтою зразка ґрунту та ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8. Штам K-8 депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером IMB B-7405.

Культивування штаму IMB B-7405 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю й енергії використовували гліцерин і глюкозу в концентрації 0,5 % (об'ємна та масова частка відповідно).

Як посівний матеріал використовували культуру *N. vaccinii* IMB B-7405 з експоненційної фази росту, вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з відповідними джерелами вуглецю у концентрації 0,5 %. Концентрація посівного матеріалу (10^4 — 10^5 клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) упродовж 48 год при 30°C.

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на рідкому мінеральному середовищі, центрифугували (5000 g, 10 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (pH 7,0), центрифугуючи (5000 g, 10 хв, 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (pH 7,0) та руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 60 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Отриманий дезінтеграт центрифугували (10000 g, 15 хв), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) встановлювали за швидкістю утворення фенілгідразону гліоксилату при 324 нм, ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41), малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) визначали за відновленням NAD^+ , а ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42), малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.82) — за відновленням NAD^+ при 340 за наявності ізоцитрату чи малату відповідно, 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2) — за відновленням NAD^+ при 340 нм за наявності 2-оксоглутарату та коензиму А, як описано раніше [11].

Активність піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1) визначали за швидкістю утворення оксалоацетату й окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою, фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2) — за швидкістю утворення пірувату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) — за утворенням ФЕП та пірувату у процесі окиснення НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) — за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм, ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31) — за окисненням НАДН при 340 нм, як описано в [11].

Активність глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2), малатдегідрогенази (декарбоксилювальної) (КФ 1.1.1.38 і КФ 1.1.1.40) встановлювали за відновленням НАД⁺ і НАДФ⁺ при 340 нм за наявності 2-оксоглутарату та малату відповідно, згідно з методиками, описаними в [11].

Активність ферментів у безклітинних екстрактах визначали при температурі 28—30 °С, що є оптимальною для росту штаму ІМВ В-7405, та виражали у нмоль/хв мг білка. Вміст білка в безклітинних екстрактах визначали за Bradford.

У табл. 1 наведено активність деяких ферментів циклу трикарбонових кислот у клітинах штаму ІМВ В-7405, вирощених на гліцерині і глюкозі.

Таблиця 1. Активність деяких ферментів циклу трикарбонових кислот у *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
НАД ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	0	0
НАДФ ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	328±16	128±6
2-Оксоглутаратдегідрогеназа	0	0
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	239±11	321±16
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	567±28	1600±80

Виявилось неочікуваним, що під час росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 як на гліцерині, так і на глюкозі у клітинах бактерій була відсутня активність ключового ферменту ЦТК — 2-оксоглутаратдегідрогенази, хоча у той же час виявлена НАД⁺- і НАДФ⁺-залежна малатдегідрогеназна активність — ферментів циклу трикарбонових кислот (табл. 1). Отже, як утворюється сукцинат у штаму ІМВ В-7405, невідомо. Слід зазначити, що у процесі культивування мікроорганізмів на неуглеводних субстратах утворення сукцинату може відбуватися в гліоксилатному циклі, ключовим ферментом якого є ізоцитратліаза [7]. Проте подальші дослідження показали, що за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на обох досліджуваних субстратах у клітинах бактерій цей фермент не функціонує, а анаплеротичною реакцією, що поповнює вміст пулу С₄ дикарбонових кислот, є ФЕП-карбоксилазна реакція (табл. 2).

Таблиця 2 Активність ферментів анаплеротичних реакцій у *N. vaccinii* IMB B-7405

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
Ізоцитратліаза	0	0
ФЕП-карбоксилаза	656±33	1200±60
Піруваткарбоксилаза	10±0,5	14±0,7
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	0	0
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	15±0,7	12±0,6

У той же час останніми роками у літературі стали з'являтися дані про альтернативні шляхи залучення 2-оксоглутарату до циклу трикарбонових кислот (перетворення 2-оксоглутаратдегідрогенази на сукцинат) у мікроорганізмів [12—14]. Так, у представників родів *Mycobacterium* і *Rhizobium* 2-оксоглутарат, утворюваний в ізоцитратдегідрогеназній реакції ЦТК, за участю 2-оксоглутаратдекарбоксилази перетворюється на сукцинат-напівальдегід, який у наступній НАД(Ф)⁺-залежній дегідрогеназній реакції відновлюється до сукцинату [12, 13]. В інших мікроорганізмів (наприклад, бактерій *Hydrogenobacter thermophiles*) сукцинат утворюється з 2-оксоглутарату у 2-оксоглутарат:фередоксин-оксидоредуктазній реакції [14]. Варто зауважити, що в Київській енциклопедії геномів і геномів [www.genome.jp/kegg/ KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database] наведена інформація про наявність цього ферменту у деяких представників роду *Nocardia*. З'ясуванню питання, які саме альтернативні шляхи залучення 2-оксоглутарату до ЦТК функціонують у штаму IMB B-7405, будуть присвячені наші подальші дослідження.

У табл. 3 наведено дані про активність ферментів біосинтезу ПАР у клітинах штаму IMB B-7405, вирощених на гліцерині та глюкозі. Ензиматичні дослідження підтвердили здатність *N. vaccinii* IMB B-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів, що засвідчила висока активність ферментів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикіназа та ФЕП-синтетаза) і НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту бактерій як на глюкозі, так і на гліцерині.

Таблиця 3 Активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин у *N. vaccinii* IMB B-7405

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
ФЕП-карбоксикіназа	820±41	1015±50

ФЕП-синтетаза	2366±118	2406±120
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	329±16	1855±92
НАД ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	0	0

Висновки

Отже, у результаті проведених досліджень визначено активність ключових ферментів циклу трикарбонових кислот, анаплеротичних і біосинтетичних шляхів у *N. vaccinii* IMB В-7405, вирощених на вуглеводних і неуглеводних субстратах. Одержані дані є вихідними для здійснення теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрації моно-субстратів у суміші з метою інтенсифікації синтезу ПАР.

Література

1. Pacwa-Plociniczak 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.
2. Kalyani R. Bishwambhar M., Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // Int. Res. J. Pharm. — 2011. — Vol. 2, № 8. — P. 11—15.
3. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97, № 6. — P. 2327—2339.
4. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97, № 3. — P. 1005—1016. doi:10.1007/s00253-012-4641-8.
5. Sylđatk C., Hausmann R. Microbial biosurfactants // Eur. J. Lipid Sci. Technol. — 2010. — Vol. 112, № 6. — P. 615—616.
6. Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // AMB Express. — 2011. — 1:5. doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
7. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
8. Кудря Н., Пирог Т. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на суміші ростових субстратів // Ukrainian food journal. — 2013. — Vol. 2, Iss. 2. — С. 203—209.
9. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец І.В. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на суміші гексадекана і глицерину // Мікробіологія. — 2012. — Т. 81, № 5. — С. 611—618.
10. Пирог Т.П., Шулякова М.О., Шевчук Т.А. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах // Biotechnologia Acta. — 2013. — Vol. 6, № 6. — P. 28—44.

11. Pirog T.P., Korzh Yu.V., Shevchuk T.A., Tarasenko D.O. Peculiarities of C₂ metabolism and intensification of the synthesis of surface active substances in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 grown in ethanol // Microbiology. — 2008. — Vol. 77, № 6. — P. 665—673.
12. Tian J., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102, № 30. — P. 10670—10675.
13. Aoshima M. Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 75, № 2. — P. 249—255.
14. Yamamoto M., Ikeda T., Arai H., Ishii M., Igarashi Y. Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophiles* // Extremophiles. — 2010. — Vol. 14, № 1. — P. 79—85. doi: 10.1007/s00792-009-0289-4.

ОСОБЕННОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 — ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, К.А. Береговая, Н.В. Кудря

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), анаплеротических и некоторых биосинтетических путей у продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 при культивировании на углеводных (глюкоза) и неуглеводных (глицерин) субстратах. В клетках штамма IMB B-7405, выращенного как на глюкозе, так и на глицерине, обнаружена НАДФ⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназная активность (128 ± 6 и 328 ± 16 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно), а также активность НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимых малатдегидрогеназ (300 — 1600 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка). Отсутствие у *N. vaccinii* IMB B-7405 активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы может свидетельствовать о функционировании в этого штамма альтернативных путей вовлечения 2-оксоглутарата в ЦТК. Восполнение пула C₄-дикарбоновых кислот у штамма IMB B-7405 происходит в фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксилазной реакции (650 — 1200 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка). Высокая активность обоих ключевых ферментов глюконеогенеза (ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-синтазы, 800 — 2400 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы (300 — 1900 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) подтвердила способность штамма IMB B-7405 к синтезу поверхностно-активных глико- и аминоклипоидов соответственно. Полученные данные являются основой для проведения теоретических расчетов оптимального молярного соотношения концентраций энергетически неравноценных субстратов для повышения синтеза ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 на их смеси.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, центральный метаболизм, анаплеротические реакции, активность ферментов, углеводные и неуглеводные субстраты.