

Т.П. Пирог<sup>1</sup>, Ю.В. Корж<sup>2</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, Д.О. Тарасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01033, Україна

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

## РОЛЬ ЕКЗОГЕННИХ ПОПЕРЕДНИКІВ В УТВОРЕННІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1 НА ЕТАНОЛІ \*

Показана можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за наявності у середовищі з етанолом цитрату (регулятора синтезу ліпідів) і фумарату (попередника глюконеогенезу). Збільшення на 40—100 % показників синтезу поверхнево-активних речовин за умови внесення цитрату (0,1 %) і фумарату (0,2 %) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлене активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що засвідчили підвищення у 1,4—1,5 і 3,4—3,6 рази активностей ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази відповідно, а також зниження у 1,5—1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази.

**К л ю ч о в і с л о в а:** поверхнево-активні речовини, біосинтез, попередники синтезу, активність ферментів, глюконеогенез, регуляція синтезу ліпідів.

Раніше ми показали можливість синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 під час росту на етанолі [8]. Дослідження впливу зовнішніх факторів на синтез ПАР у процесі культивування продуцента на цьому субстраті дали змогу збільшити у 3 рази кількість утворених ПАР, проте показники їхнього синтезу залишались у кілька разів нижчими, ніж на *n*-гексадекані. Слід зазначити, що етанол є значно дешевшим і технологічнішим субстратом порівняно з водонерозчинними гідрофобними сполуками, а отже, використання його для біосинтезу ПАР може підвищити ефективність технології отримання ПАР.

Одним із шляхів інтенсифікації технологій мікробного синтезу є виявлення можливих сайтів метаболічного лімітування і розроблення підходів до їхнього усунення на основі визначення особливостей енергетичного і конструктивного метаболізму продуцентів практично важливих метаболітів. Так, дослідження регуляції С<sub>2</sub>-метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 — продуцента полісахариду етаполану — дало змогу розробити спосіб його отримання на незабуференому середовищі, в якому загальний вміст солей було знижено у 4 рази (до 2,95 г/л) [3]. Ми розпочали такі дослідження з *R. erythropolis* ЕК-1 [10].

Ще одним підходом до підвищення ефективності технологій отримання продуктів мікробного синтезу є внесення екзогенних попередників у середовище культивування продуцента. Так, раніше ми довели можливість інтенсифікації синтезу етаполану внесенням у середовище С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот — інтермедіатів метаболізму етанолу, які є попередниками глюконеогенезу [5]. З літературних даних відомо, що за наявності попередників підвищується синтез макролідних антибіотиків [6, 7]. У 80—90-х роках ХХ ст. дослідниками було встановлено стимулювальний вплив цитрату натрію на утворення ПАР мікроорганізмами [2, 4, 15, 22]. Такий ефект по-

\* Робота виконана за часткового фінансування за рахунок бюджетних коштів для підтримки об'єкта національного надбання — “Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України”.

яснюють активуючим впливом цитрату на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, і ПАР ліпідної природи [20].

З огляду на викладене, мета цієї роботи полягала у дослідженні впливу попередників на утворення ПАР під час росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі і встановленні механізмів, що забезпечують підвищення синтезу ПАР за таких умов культивування.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень був *R. erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ Ас-5017.

*Культивування R. erythropolis* ЕК-1. Бактерії вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу, г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,8;  $\text{NaOH}$  — 1,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,4;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,01; рН 6,8—7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол концентрацією 2 % (об'ємна частка).

Як попередники синтезу ПАР використовували цитрат натрію і фумарат натрію концентрацією 0,1 і 0,2 % відповідно, які додавали у середовище у вигляді 10%-х розчинів. Попередники синтезу ПАР вносили на початку процесу культивування, а також на початку стаціонарної фази росту.

Оскільки цитрат і фумарат є додатковими джерелами вуглецевого живлення і за умови добавлення їх у середовище змінюється не лише концентрація вуглецю, а й співвідношення С/Н, у контрольних варіантах коригували вміст основного джерела вуглецю (етанолу). Мета коригування — ввести еквімолярну кількість вуглецю для забезпечення стабільності оптимального співвідношення вуглець/азот у середовищі культивування продуцента.

Бактерії вирощували в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 48—120 год.

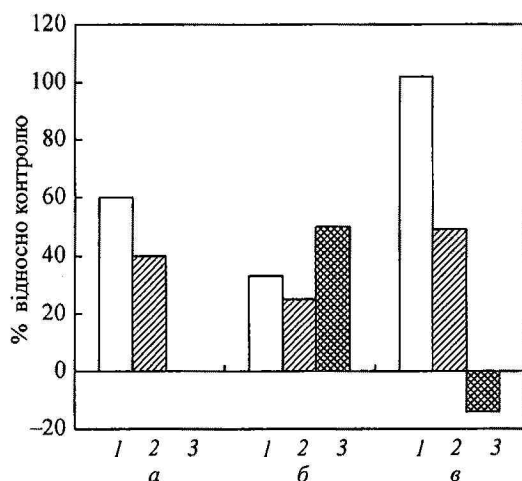
Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на м'ясопептонному або глюкозо-картопляному агарі, а також культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5 % етанолу за наявності або відсутності попередників синтезу ПАР. У разі використання рідкого інокуляту його концентрація становила 5 % об'єму середовища.

*Визначення показників росту і синтезу ПАР.* Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху масу за калібрувальним графіком.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг ( $\sigma$ ) вільної від клітин культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР<sup>\*</sup>), індекс емульгування ( $E_{24}$ ) розбавленої у 50 разів культуральної рідини, а також кількість синтезованих ПАР, які визначали, як описано у працях [8, 9].

Для визначення кількості синтезованих ПАР використовували модифікований нами метод Блайя і Дайера [1]. Необхідність його модифікації була зумовлена тим, що *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів [8, 9], а за відомим методом Блайя і Дайера для виділення ПАР можна вилучати в основному неполярні ліпіди. Тому ми модифікували класичну систему розчинників (суміш Фолча) введенням до неї 1 М  $\text{HCl}$  (хлороформ : метанол : вода = 4:3:2). Така система дає змогу максимально повно виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

*Отримання безклітинних екстрактів.* Культуральну рідину після культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому середовищі центрифугували (4000 г, 15 хв, 4 °С). Осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 г, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 4 рази по 60 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Отриманий дезінтеграт центрифугували (12000 г, 30 хв, 4 °С),



Утворення ПАВ під час вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом за наявності попередників біосинтезу: а — ПАВ<sup>+</sup>; б — індекс емульгування ( $E_{24}$ , %); в — концентрація ПАВ, г/л. Концентрація попередників, %: 1 — фумарат (0,2) + цитрат (0,1); 2 — фумарат (0,2); 3 — цитрат — (0,1). Внесення фумарату і цитрату здійснювали на початку стаціонарної фази росту. Посівний матеріал вирощено на етанолі

осад відкидали, надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт. Для отримання останніх використовували клітини із середини і пізньої експоненційної та ранньої стаціонарної фаз росту (24, 48 і 72 год культивування відповідно).

**Ензиматичні аналізи.** Активність ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) [21] визначали за відновленням НАДФ<sup>+</sup>, а малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) [19] — НАД<sup>+</sup> при 340 нм за наявності ізоцитрату чи малату як субстратів відповідно.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) [16] встановлювали за швидкістю утворення фенілгідразону гліоксилату при 324 нм.

Активність фосфоенолпіруватсинтетази (ФЕП-синтетаза, КФ 2.7.9.2) [14] аналізували за швидкістю утворення пірувату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою. Активність ФЕП-синтетази визначали також колориметрично за зниженням концентрації пірувату в реакційній суміші (реакція з динітрофенілгідразиним) при 445 нм [14].

Активність ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) [18] встановлювали за утворенням ФЕП у процесі окиснення НАДН при 340 нм.

Активність ферментів виражали в наномолях отриманого за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за М. Bradford [13].

Активність ферментів аналізували при 28—30 °С — оптимальній температурі для росту *R. erythropolis* ЕК-1.

**Результати та їх обговорення.** Раніше ми встановили, що ПАВ, синтезовані *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі, містять гліко-, фосфо- і нейтральні ліпіди, які утворюють комплекс зі сполуками полісахаридно-білкової природи [8, 9]. З урахуванням хімічної природи ПАВ ми припустили, що можна підвищити ефективність процесу їхнього біосинтезу внесенням у середовище цитрату — регулятора синтезу ліпідів, а також С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот (фумарату) — попередників глюконеогенетичної гілки обміну речовин, що функціонує під час вирощування бактерій на неуглеводних субстратах, у тім числі й на етанолі.

На підставі результатів попередніх експериментів встановлено, що внесення цитрату натрію концентрацією 0,1—0,5 % так само, як і фумарату натрію (0,1—0,3 %), у середовище з етанолом на початку процесу культивування супроводжувалося деяким підвищенням рівня біомаси, але не концентрації ПАВ [11]. Ці закономірності виявились однаковими незалежно від способу підготовки посівного матеріалу (інокулят, вирощений на етанолі за наявності чи відсутності відповідних попередників).

Введення фумарату і цитрату наприкінці експоненційної — початку стаціонарної фаз росту дало змогу інтенсифікувати синтез ПАВ (рисунок). Так, за

наявності 0,2 % фумарату ПАР\* і кількість синтезованих ПАР підвищувалися майже у 1,4—1,5 раза порівняно з показниками культивування на середовищі без фумарату. За наявності у середовищі з етанолом цитрату (0,1 %) інтенсифікувався синтез метаболітів з емульгувальними властивостями, про що засвідчувало підвищення індексу емульгування культуральної рідини у 1,5 раза, ПАР\* залишалася без змін, а кількість синтезованих ПАР дещо зменшувалася. Одночасне внесення у середовище з етанолом на початку стаціонарної фази росту 0,2 % фумарату і 0,1 % цитрату супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих ПАР на 100 %, індексу емульгування — на 35 %, ПАР\* — на 60 % порівняно з показниками синтезу на середовищі без фумарату і цитрату. Отримані дані є свідченням можливості регуляції процесів біосинтезу у *R. erythropolis* ЕК-1 і зміни їхньої спрямованості у бік утворення ПАР.

З метою встановлення механізмів, які зумовлюють підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за наявності попередників, на наступному етапі аналізували активність ферментів, що забезпечують залучення фумарату і цитрату до метаболізму під час вирощування продуцента на етанолі, а також ферментів деяких біосинтетичних шляхів.

Як засвідчують наведені у табл. 1 дані, за наявності фумарату і цитрату в середовищі з етанолом під час отримання посівного матеріалу і біосинтезу ПАР спостерігали підвищення активності ізоцитратдегідрогенази (особливо за наявності цитрату) і зниження ізоцитратліазної активності. Активності фумаратгідратази і малатдегідрогенази практично не змінювались у процесі росту *R. erythropolis* ЕК-1 як на середовищі з етанолом, так і на середовищі з етанолом і попередниками. Отримані дані можуть свідчити на користь залучення екзогенних попередників переважно на шляхи енергетичного, а не конструктивного метаболізму. Згідно з літературними даними, за наявності цитрату в середовищі культивування *Bacillus subtilis* підвищення синтезу сурфактину корелювало зі зниженням ізоцитратдегідрогеназної активності у клітинах бактерій, що може свідчити про спрямованість потоку вуглецю субстрату на процеси конструктивного метаболізму, тобто на синтез ПАР [15]. Автори пояснюють таке явище тим, що цитрат є важливим ефектором ацетил-КоА-карбоксилази — ключового ферменту синтезу жирних кислот. Так, пізніше було показано, що за наявності 1 мМ цитрату активність ацетил-КоА-карбоксилази підвищувалася на 40 % [17].

У табл. 1 наведено активність ферментів для клітин із середини експоненційної фази росту. Результати подальших експериментів показали, що такі ж

Таблиця 1

**Вплив фумарату і цитрату на активність ферментів, що зумовлюють залучення цих попередників до метаболізму у процесі росту *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом**

Фермент	Активність під час вирощування на етанолі за наявності попередників, нмоль/(хв · мг білка)			
	без попередників	цитрату (0,1 %)	фумарату (0,2 %)	цитрату (0,1 %) і фумарату (0,2 %)
НАДФ <sup>+</sup> -залежна ізоцитратдегідрогеназа	400 ± 18	778 ± 35	554 ± 25	517 ± 23
Ізоцитратліаза	733 ± 32	643 ± 30	318 ± 12	622 ± 30
НАД <sup>+</sup> -залежна малатдегідрогеназа	143 ± 5	123 ± 4	151 ± 5	114 ± 3
Фумаратгідратаза	270 ± 12	231 ± 10	248 ± 10	202 ± 9

Примітка. Інокулянт вирощено на середовищі з етанолом і відповідними попередниками; активність ферментів визначали для клітин із середини експоненційної фази росту.

закономірності спостерігали і на початку стаціонарної фази росту *R. erythropolis* ЕК-1, тобто характер зміни активності ферментів за наявності фумарату і цитрату був аналогічний тому, що подано у табл. 1.

У наступних дослідженнях встановлено, що за умови використання посівного матеріалу, вирощеного на етанолі, вплив екзогенного цитрату і фумарату на активність досліджуваних ферментів відрізнявся від визначеного раніше (табл. 1). Так, незалежно від моменту внесення попередників у середовище з етанолом спостерігали зниження ізоцитрадегідрогеназної і підвищення ізоцитратліазної активностей порівняно з показниками культивування бактерій за відсутності фумарату і цитрату (табл. 2). Звертає на себе увагу суттєвіша зміна активності цих ферментів за внесення попередників наприкінці експоненційної фази росту. Так, при внесенні цитрату на початку процесу культивування активність ізоцитратдегідрогенази знизилась у 1,5 раза, а ізоцитратліази підвищилась у 1,2 раза, у той час як внесення цитрату наприкінці експоненційної фази росту супроводжувалось зниженням активності ізоцитратдегідрогенази і підвищенням активності ізоцитратліази у 1,7 і 2 рази відповідно. За внесення фумарату, а також фумарату і цитрату спостерігали підвищення активностей фумаратгідратази і малатдегідрогенази (табл. 2).

Встановлено, що під час росту на етанолі у *R. erythropolis* ЕК-1 функціонують два ключові ферменти глюконеогенезу — ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза (табл. 2). У процесі росту бактерій на етанолі за наявності попередників біосинтезу ПАР активність ФЕП-карбоксикінази знижувалась у 1,6—2,0 раза, у той час як ФЕП-синтетазна активність підвищувалась у 2,5—3,6 раза порівняно з вирощуванням *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі без фумарату і цитрату. Найвищі значення ФЕП-синтетазної активності спостерігали за внесення фумарату і цитрату наприкінці експоненційної фази росту — до 2000 нмоль/(хв · мг білка).

Таким чином, наявність фумарату і цитрату у середовищі з етанолом активує функціонування глюконеогенетичної гілки обміну у *R. erythropolis* ЕК-1.

Наведені у табл. 2 дані ензиматичних досліджень засвідчують, що внесення фумарату і цитрату у середовище з етанолом супроводжується зміною спрямованості метаболічних процесів у *R. erythropolis* ЕК-1 у бік біосинтезу. За попередніми дослідженнями [11] і даними, наведеними на рисунку, посилення синтезу ПАР спостерігається лише за умови внесення попередників наприкінці експоненційної — напочатку стаціонарної фаз росту. Наявність фумарату і цитрату у середовищі з початку процесу культивування лише підвищує синтез біомаси.

Слід зазначити, що відомі дотепер літературні дані вказують на можливість інтенсифікації синтезу ПАР за наявності цитрату [2, 4, 15, 20, 22], проте встановлені нами закономірності відрізняються від описаних у літературі. Так, згідно із літературними даними, цитрат вносили концентрацією 0,5—1,0 % на початку процесу культивування продуцентів ПАР. За такої концентрації цитрат можна розглядати як додатковий ростовий субстрат, а не регулятор синтезу ліпідів. На сьогодні у літературі практично відсутні відомості щодо впливу  $C_4$ -дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу — на синтез ПАР. Відомо, що внесення солей органічних кислот циклу Кребса (сукцинату і фумарату концентрацією 0,5 %) у середовище культивування *B. subtilis* С-14 на початку процесу культивування супроводжувалось збільшенням кількості синтезованих ПАР у 1,5—2,0 раза [12]. При цьому спостерігали також підвищення рівня біомаси, індексу емульгування і показника ПАР\*.

Слід зазначити, що нам не відомі дані стосовно підвищення синтезу ПАР за одночасної наявності у середовищі культивування як цитрату, так і  $C_4$ -дикарбонових кислот. Поряд з цим нині залишаються практично не дослідженими механізми, що забезпечують інтенсифікацію утворення ПАР у відповідь на наявність у середовищі

Таблиця 2

Активність деяких ферментів залежно від моменту внесення цитрату і фумарату під час культивування *R. erythrorolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом

Момент внесення попередників	Попередник	Активність, нмоль/(хв · мг білка)					
		НАДФ <sup>+</sup> -залежна ізоцитратдегідрогеназа	Ізоцитратпіаза	Фумаратгідратаза	НАД <sup>+</sup> -залежна малдегідрогеназа	ФЕП-карбоксікіназа	ФЕП-синтетаза
Без попередників	—	632 ± 30	515 ± 20	256 ± 10	201 ± 8	603 ± 28	556 ± 25
На початку процесу культивування	Цитрат (0,1%) Фумарат (0,2%)	417 ± 18 530 ± 25	623 ± 30 735 ± 32	96 ± 3 508 ± 20	147 ± 5 300 ± 12	238 ± 10 299 ± 13	870 ± 40 1300 ± 58
Наприкінці експоненційної фази	Цитрат (0,1%) + фумарат (0,2%) Цитрат (0,1%) Фумарат (0,2%) Цитрат (0,1%) + фумарат (0,2%)	385 ± 15 368 ± 15 432 ± 20 404 ± 15	598 ± 26 1063 ± 45 840 ± 40 717 ± 30	321 ± 12 152 ± 6 784 ± 35 421 ± 20	255 ± 10 159 ± 5 354 ± 15 297 ± 12	365 ± 16 238 ± 10 292 ± 12 367 ± 16	1457 ± 60 1300 ± 61 1500 ± 72 1980 ± 95

Примітка. Посівний матеріал вирощено на етанолі; активність ферментів визначали для клітин, які перебували на початку стаціонарної фази росту.

попередників їхнього синтезу. Так, за наявності цитрату знижується активність ізоцитратдегідрогенази у клітинах *B. subtilis* [15], тобто посилення синтезу сурфактину автори пояснюють переважними витратами вуглецю субстрату на процеси біосинтезу ПАР. Водночас для дріжджів *Torulopsis apicola* — продуцента поверхнево-активних гліколіпідів — встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтримці рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлужнення культуральної рідини в результаті транспорту цитрату шляхом симпорту з протоном, що й забезпечує посилення синтезу ПАР [22]. Аналогічну дію на синтез ПАР *T. apicola* справляли солі й інших органічних кислот (сукцинату, тартрату і малонату).

У результаті проведених нами досліджень доведено, що за наявності фумарату і цитрату у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 посилюється глюконеогенез, свідченням чого є підвищення активностей ізоцитратліази і ФЕП-синтетази, а також синтезу ліпідів, про що може засвідчити зниження ізоцитратдегідрогеназної активності. Така зміна активності ферментів зумовлює інтенсифікацію синтезу ПАР гліколіпідної природи у процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі за наявності попередників.

Т.П. Пирог<sup>1</sup>, Ю.В. Корж<sup>2</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, Д.А. Тарасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Національний університет пищевих технологий, Киев

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

#### РОЛЬ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ОБРАЗОВАНИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЭК-1 НА ЭТАНОЛЕ

##### Резюме

Показана возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 при наличии в среде с этанолом цитрата (регулятора синтеза липидов) и фумарата (предшественника глюконеогенеза). Увеличение на 40—100 % показателей синтеза поверхностно-активных веществ при внесении цитрата (0,1 %) и фумарата (0,2 %) в начале стационарной фазы роста продуцента обусловлено активацией глюконеогенетической ветви обмена и усилением синтеза липидов, про что свидетельствовало увеличение в 1,4—1,5 и 3,4—3,6 раза активности изоцитратлиазы и фосфоенолпируватсинтетазы соответственно, а также снижение в 1,5—1,6 раза активности изоцитратдегидрогеназы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: поверхностно-активные вещества, биосинтез, предшественники синтеза, активность ферментов, глюконеогенез, регуляция синтеза липидов.

Т.П. Pirog<sup>1</sup>, Yu. V. Korzh<sup>2</sup>, T.A. Shevchuk<sup>2</sup>, D.O. Tarasenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National University of Food Technologies, Kyiv

<sup>2</sup> Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

#### ROLE OF EXOGENIC PRECURSORS IN FORMATION OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES DURING CULTIVATION *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* EK-1 ON ETHANOL

##### Summary

A possibility to intensify synthesis of surfactants of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 under the presence of citrate (lipid synthesis regulator) and fumarate (gluconeogenesis precursor) has been shown. A 40—100 % increase of indices of surfactants synthesis with introduction of cytrate (0.1 %) and fumerate (0.2 %) in the beginning of the stationary producer growth phase is determined by activation of gluconeogenetic branch of metabolism and by intensification of lipids synthesis that was evidenced by the 1.4—1.5-fold and 3.4—3.6-fold increase of isocitrate liase and phosphoenolpyruvate synthetase activities, respectively, as well as by a 1.5—1.6-fold decrease of activity of isocitrate dehydrogenase.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: surface-active substances (surfactants), biosynthesis of synthesis precursors, enzyme activity, gluconeogenesis, lipid synthesis regulation.

The author's address: T.P. Pirog, National University of Food Technology, 68  
Vladimirskaya St., Kyiv, 02033, Ukraine.

1. Биохимические исследования мембран / Под ред. Э. Медди. — Москва: Мир, 1979. — 300 с.
2. Вильданова-Марцишин Р.И. Биосинтез поверхностно-активных веществ штаммами *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1169, *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1163 и *Pseudomonas* sp. PS-17: Дис. ... канд. биол. наук. — Киев: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2004. — 155 с.
3. Корж Ю.В. Регуляція  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 — продуцента екзополісахариду етаполану: Дис. ... канд. біол. наук. — Київ: Ін-т мікробіології і вірусології НАН України, 2005. — 152 с.
4. Лесык О.Ю., Елисеєв С.А., Полулях О.В., Карпенко Ю.В. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // Микробиол. журн. — 1991. — 53, № 2. — С. 36—40.
5. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом // Там же. — 1993. — 55, № 2. — С. 35—41.
6. Миронов В.А., Сергеева А.В., Воронкова В.В., Даниленко В.Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиотики и химиотерапия. — 1997. — 42, № 3. — С. 31—36.
7. Навашин М.С., Федоренко В.А., Настасян И.Н., Миронов В.А., Кириченко Н.В., Даниленко В.Н. Генетический и биохимический контроль биосинтеза макролидных антибиотиков // Там же. — 1990. — 35, № 12. — С. 34—38.
8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикл. биохимия и микробиология. — 2004. — 40, № 5. — С. 544—550.
9. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. — 2005. — № 6. — С. 27—36.
10. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А. Особенности окисления этанола и ацетальдегида у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 — продуцента поверхностно-активных веществ // Сборник трудов Междунар. науч. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (Минск, 3—6 июня 2008 г.). — Минск, 2008. — С. 263—265.
11. Тарасенко Д.О. Інтенсифікація синтезу мікробних поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // III Міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь та поступ біології” (Львів, 23—27 квіт. 2007 р.): Тези доп. — Львів, 2007. — С. 370.
12. Шульга А.Н. Поверхностно-активные соединения, образуемые культурой бактерий *Vacillus subtilis* С-14: Дис. ... канд. биол. наук. — Киев: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1993. — 163 с.
13. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72, N 3. — P. 248—254.
14. Cooper R.A., Cornberg H.L. Phosphoenolpyruvate synthetase // Methods in enzymology / Ed. J.M. Lowenstein. — New York; London: Acad. Press, 1969. — Vol. 13. — P. 309—314.
15. De Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // Can. J. Microbiol. — 1989. — 35, N 9. — P. 854—859.
16. Dixon G.H., Kornberg H.S. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle // Biochem. J. — 1959. — 72, N 1. — P. 195—196.
17. Herbert D., Price L.J., Alban C., Dehaye L., Job D., Cole D.J., Pallette K.E., Harwood J.L. Kinetic studies on two isoforms of acetyl-CoA-carboxylase from maize leaves // Biochem. J. — 1996. — 318. — P. 997—1006.
18. Huei-Che Chang, Lane M.D. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. 2. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase // J. Biol. Chem. — 1966. — 241, N 10. — P. 2413—2420.
19. Kitto G.B. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart // Methods in enzymology / Ed. J.M. Lowenstein. — New York; London: Acad. Press, 1969. — Vol. 13. — P. 106—116.
20. Kosaric N., Cairns W.L., Cray N.C.C. The role of nitrogen in microorganism strategies for biosurfactant production // JACS. — 1984. — 106, N 11. — P. 1735—1743.
21. O'Brien R.W., Stern J.R. Requirement for sodium in the anaerobic growth of *Aerobacter aerogenes* on citrate // J. Bacteriol. — 1969. — 98, N 2. — P. 388—393.
22. Stuver O., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain *Torulopsis apicola* // J. Biotechnology. — 1987. — 6. — P. 259—269.

Отримано 10.07.2007