

Пирог, Т.П. Особенности C_2 -метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле / Т. П. Пирог, Ю. В. Корж, Т. А. Шевчук, Д. А. Тарасенко // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 6. – С. 749–757.

УДК 759.873.088.5:661.185

**ОСОБЕННОСТИ C_2 -МЕТАБОЛИЗМА И ИНТЕНСИФИКАЦИЯ
СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
У ШТАММА *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ЭК-1,
РАСТУЩЕГО НА ЭТАНОЛЕ**

Т. П. Пирог¹, Ю. В. Корж, Т. А. Шевчук, Д. А. Тарасенко

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук
Украины, Киев*

Окисление этанола у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 – продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ), осуществляется 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин (НДМА)-зависимой алкогольдегидрогеназой, окисление ацетальдегида – НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимыми дегидрогеназами с оптимумом рН 9.5, окисление ацетата – ацетаткиназой и ацетил-КоА-синтетазой. При росте на этаноле в клетках *R. erythropolis* ЭК-1 функционирует как глиоксилатный цикл, так и полный цикл трикарбоновых кислот, синтез фосфоенолпирувата (ФЕП) обеспечивается двумя ключевыми ферментами глюконеогенеза – ФЕП-карбоксикиназой и ФЕП-синтетазой.

Внесение в среду культивирования *R. erythropolis* ЭК-1, содержащую 2 % этанола, цитрата (0.1 %) и фумарата (0.2 %) сопровождалось усилением глюконеогенеза, что подтверждается повышением в 1.5 и 3.5 раза активности изоцитратлиазы и ФЕП-синтетазы (ключевых ферментов глиоксилатного цикла и глюконеогенетической ветви обмена веществ соответственно), а также синтеза липидов, о чем может свидетельствовать снижение в 1.5 раза активности изоцитратдегидрогеназы. В присутствии фумарата и цитрата показатели синтеза ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЭК-1 на этаноле повышались на 40–100 %.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, метаболизм этанола, глиоксилатный цикл, глюконеогенез, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества.

Штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 выделен нами из загрязненных нефтью образцов почвы [1]. Ранее было показано, что *R. erythropolis* ЭК-1 образует поверхностно-активные вещества (ПАВ) при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах [2], причем показатели синтеза ПАВ на этаноле были существенно ниже, чем на гексадекане. Учитывая, что этанол является более дешевым и технологичным субстратом по сравнению с водонерастворимыми гидрофобными соединениями, использование его для биосинтеза ПАВ может существенно повысить эффективность технологии получения поверхностно-активных веществ. Следует также отметить, что в литературе имеются немногочисленные данные о способности бактерий рода *Rhodococcus* ассимилировать этанол в качестве источника углерода и энергии [3, 4], но нам не удалось обнаружить сведения о синтезе ПАВ при росте родококков на этом субстрате.

Одним из путей интенсификации технологий микробного синтеза является выявление возможных сайтов метаболического лимитирования и разработка подходов к их устранению на основе анализа особенностей энергетического и конструктивного метаболизма продуцентов практически ценных метаболитов. Предыдущие исследования регуляции C_2 -метаболизма у *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 – продуцента полисахарида этаполана, позволили разработать способ его получения на незабуференной среде, в которой содержание солей было снижено в четыре раза (до 2.95 г/л) [5].

Другим подходом, позволяющим повысить эффективность микробных биотехнологий, является внесение экзогенных предшественников в среду культивирования продуцента. Так, ранее нами была установлена возможность интенсификации синтеза этаполана при внесении в среду C_4 -

дикарбоновых кислот – интермедиатов метаболизма этанола, вовлекаемых в глюконеогенез [6]. Из литературы известно, что введение в среду культивирования предшественников повышает синтез макролидных антибиотиков [7]. В 80–90-х годах XX ст. рядом исследователей было установлено стимулирующее влияние цитрата натрия на образование ПАВ микроорганизмами [8–10]. Наши исследования показали, что при внесении в среду с гексадеканом фумарата (0.2 %) и цитрата (0.1 %) в начале стационарной фазы роста *R. erythropolis* ЭК-1 показатели синтеза ПАВ повышались на 40–70 % по сравнению с аналогичными показателями при выращивании штамма на среде без этих предшественников [11].

Цель данной работы – исследование особенностей метаболизма этанола у *R. erythropolis* ЭК-1 и установление возможных механизмов повышения синтеза ПАВ на этом субстрате в присутствии предшественников (фумарата и цитрата).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследований. Объектом исследований являлся штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером ИМВ Ас-5017.

Состав сред и условия культивирования *R. erythropolis* ЭК-1. Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава (г/л): **Среда 1:** KNO_3 – 1.5; NaCl – 1.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.6; KH_2PO_4 – 0.14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, pH 6.8–7.0. **Среда 2:** KH_2PO_4 – 6.8; NaOH – 1.0; NH_4NO_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, pH 6.8–7.0. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 2 % (по объему). Среда 1 представляет собой модифицированную нами [1] среду Мюнца [12], которая используется для выращивания углеводородокисляющих бактерий. Среда 2 разработана нами для культивирования продуцентов биополимеров [5].

В одном из вариантов опыта в среду с этанолом вносили предшественники синтеза ПАВ – цитрат натрия и фумарат натрия в концентрации 0.1 и 0.2 % соответственно. Указанные предшественники добавляли в среду в виде 10 %-ных растворов в начале процесса культивирования, а также в начале стационарной фазы роста.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродного питания, и при их внесении в среду изменяется не только концентрация углерода, но и соотношение C/N, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания основного источника углерода (этанола). Цель такой коррекции – введение эквимольного количества углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в среде культивирования продуцента.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30°C в течение 24–68 ч.

В качестве посевного материала использовали суточную культуру, выращенную на мясо-пептонном (МПА) или глюкозо-картофельном (ГКА) агаре, а также культуру в экспоненциальной фазе роста (48–72 ч), выращенную на средах 1 и 2, содержащих 0.5 % этанола (по объему) в присутствии или отсутствие предшественников синтеза ПАВ. При использовании инокулята, выращенного в жидкой среде, его концентрация составляла 5 % от объема засеваемой среды.

Определение показателей роста и синтеза ПАВ. Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес по калибровочному графику.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по показателям:

1) поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью стеклянной пластинки [1, 2];

2) для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель условной концентрации ПАВ (ПАВ*), который определяли как степень разведения свободной от

клеток культуральной жидкости (супернатанта) до точки ККМ (критическая концентрация мицеллообразования). Строили график зависимости поверхностного натяжения σ_s от значения логарифма разведения супернатанта [1, 2]. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению ПАВ*. Условная концентрация ПАВ выражается в безразмерных единицах;

3) индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости, который определяли как описано в работе [1]. В качестве гидрофобного субстрата для эмульгирования использовали подсолнечное масло.

4) количество синтезированных ПАВ, которое определяли весовым методом Блайя и Дайера [13] в нашей модификации. Необходимость модификации была обусловлена тем, что штамм *R. erythropolis* ЭК-1 синтезирует комплекс полярных и неполярных липидов [1, 2], а метод Блайя и Дайера дает возможность извлекать в основном неполярные липиды. В связи с этим мы модифицировали классическую систему растворителей (смесь Фолча) введением в нее 1 М HCl (хлороформ : метанол : 1М HCl = 4 : 3 : 2).

Получение бесклеточных экстрактов. Бактериальную суспензию, полученную после культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4°C). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0.05 М K^+ -фосфатным буфером (pH 7.0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4°C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0.05 М K^+ -фосфатном буфере (pH 7.0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 4 раза по 60 с при 4°C на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4°C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Для получения бесклеточных экстрактов использовали клетки, находящиеся в ранней, середине и поздней экспоненциальной фазе роста (24, 48 и 72 ч культивирования соответственно).

Энзиматические анализы. Активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1, КФ 1.1.1.2 и КФ 1.1.99.8), ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3,

КФ 1.2.1.4, КФ 1.2.1.10), ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1), изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) определяли как описано в работе [14]. Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99. –) и ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.99. –) определяли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина (НДМА) при 440 нм с этанолом, метанолом и ацетальдегидом как донорами электронов соответственно [15]. Активность алкогольоксидазы (КФ 1.1.3.13) анализировали по образованию H_2O_2 или потреблению растворенного кислорода как описано в работе [16]. Активность ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.99.3) определяли по восстановлению дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата при 600 нм [17]

Активность малатсинтазы (КФ 4.1.3.2), цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7), аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41 и КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1), фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37, КФ 1.1.1.82), малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) (КФ 1.1.1.38 и КФ 1.1.1.40), фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49) анализировали как описано в работе [6].

Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Bradford [18]. Активность ферментов определяли при 28–30°C – температуре, оптимальной для роста штамма *R. erythropolis* ЭК-1.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от трех до пяти. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [19]. Результаты исследований согласно *t*-критерия Стьюдента оказались статистически достоверными при 5%-ном уровне значимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5 . С. 544– 550.
2. 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.
3. de Carvalho C., Parreno-Marchante B., Neumann G., da Fonseca M., Heipieper H. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. P. 383–388.
4. de Carvalho C., da Fonseca M. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 51. P. 388–399.
5. Корж Ю.В. Регуляция C₂-метаболизма у *Acinetobacter* sp. В-7005 – продуцента экзополисахарида этаполана. Автореф. дис...канд. биол. наук. – Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2005. 21 с.
6. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 459–465.
7. Миронов В.А., Сергеева А.В., Воронкова В.В., Даниленко В.Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиот. и химиотер. 1997. Т. 42. № 3. С. 31–36.
8. Stuwer O., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain *Torulopsis apicola* // J. Biotechnology. 1987. V. 6. P. 259–269.

9. *de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F.* Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // *Can. J. Microbiol.* 1989. V. 35. № 9. P. 854–859.

10. *Лесык О.Ю., Елисейев С.А., Полулях О.В., Карпенко Ю.В.* Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // *Микробиол. журн.* 1991. Т. 53. № 2. С. 36–40.

11. *Tarasenko D., Pirog T.* Intensification of surface-active substances' synthesis by strain *Rhodococcus erythropolis* EK-1 // *Int. conf. "Modern problems of Microbiology and Biotechnology"* (Odessa, 28–31 May, 2007). P. 86.

12. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под ред. Д.Г.Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.

13. *Биохимические исследования мембран* / Под ред. Э. Медди. М.: Мир, 1979. 300 с.

14. *Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р.* Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // *Микробиология.* 2002. Т. 71. № 2. С. 222–229.

15. *Schenkels P., Duine J.A.* Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of broad spectrum of alcohols and interconversion of alcohols and aldehydes // *Microbiology.* 2000. V.146. P. 775–785.

16. *Suye S.* Purification and properties of alcohol oxidase from *Candida methanosorbosa* M-2003 // *Curr. Microbiol.* 1997. V. 34. P. 374–377.

17. *Dailly Y., Mat-Jan F., Clark D.P.* Novel alcohol dehydrogenase activity in a mutant of *Salmonella* able to use ethanol as carbon source // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 201. № 1. P.41–45.

18. *Bradford M.* A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
19. *Лакун Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
20. *Peng X., Taki H., Komukai S.* Characterization of four *Rhodococcus* alcohol dehydrogenase genes responsible for the oxidation of aromatic alcohols // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 71. P. 824–832.
21. *Reid M.F., Fewson C.A.* Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases // *Crit. Rev. Microbiol.* 1994. V. 20. P. 13–56.
22. *van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J. A.* Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212. P. 819–826.
23. *Bruchhaus I., Tannich E.* Purification and molecular characterization of the NAD⁺-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica* // *Biochem. J.* 1994. V.303. № 3. P.743–748.
24. *Cobessi D., Tete-Favier F., Marchal S., Azza S., Branlant G., Aubry A.* Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans* // *J Mol. Biol.* 1999. V.290. № 1. P.161–173 .
25. *Yan R.T., Chen J.S.* Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V.56. № 9. P.2591–2599.
26. *Jaureguibeitia A., Saa M., Llama M.J., Serra J.L.* Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 73. P. 1073–1086.
27. *de Carvalho C., da Fonseca M.* The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 67. P. 715–726.