

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛЮКОЗИ І ГЛІЦЕРОЛУ У *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405

Т. П. ПИРОГ^{1,2}, Т. А. ШЕВЧУК¹, Х. А. БЕРЕГОВА², Н. В. КУДРЯ²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;

²Національний університет харчових технологій, Київ, Україна;

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Встановлено, що глюкоза у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 асимілюється в пентозофосфатному циклі, а також розщепленням через глюконат (активність NAD^+ -залежної глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і FAD^+ -залежної глюкоздегідрогенази 835 ± 41 і 698 ± 35 нмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ протеїну відповідно). Утворений в глюконокіназній реакції 6-фосфоглюконат залучається у пентозофосфатний цикл (активність конститутивної $NADP^+$ -залежної 6-фосфоглюконат-дегідрогенази 357 ± 17 нмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ протеїну). Катаболізм гліцеролу до дигідроксіацетонфосфату (інтермедіат гліколізу) може здійснюватися двома шляхами: через гліцерол-3-фосфат (активність гліцеролкінази 244 ± 12 нмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ протеїну) і через дигідроксіацетон. Поповнення пулу C_4 -дикарбонових кислот у клітинах штаму ІМВ В-7405 в умовах росту як на глюкозі, так і гліцеролі відбувається у фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазній реакції ($714\text{--}803$ нмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ протеїну). Залучення 2-оксоглутарату до циклу трикарбонових кислот відбувається альтернативним шляхом за участю 2-оксоглутаратсинтази. Виявлена активність обох ключових ензимів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикінази і ФЕП-синтази), трегалозофосфатсинтази і $NADP^+$ -залежної глутаматдегідрогенази підтвердила здатність штаму ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів відповідно.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, катаболізм глюкози та гліцеролу, ключові ензими, активність ензимів, анаплеротичні реакції, біосинтез.

Синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються в різних галузях промисловості, у зв'язку з чим попит на них постійно зростає. Разом з тим темпи розвитку біотехнології на сучасному етапі та підвищена увага до збереження довкілля зумовили великий інтерес дослідників до ПАР, які зазнають біодеградації, і нетоксичних мікробних ПАР, які можуть стати альтернативою хімічним аналогам [1]. Більшість існуючих технологій мікробних ПАР передбачають культивування продуцентів на дорогих гідрофобних субстратах (*n*-алканах), тому що саме за таких умов синтез цільового продукту є максимальним [1]. Заміна водонерозчинних джерел вуглецю на технологічніше може зменшити витрати на культивування та знизити вартість готової продукції.

Крім того, одним із підходів до інтенсифікації технологій мікробного синтезу практично цінних продуктів є використання

суміші ростових субстратів [2]. Наші попередні дослідження показали можливість використання суміші ростових субстратів (*n*-гексадекан, гліцерол, етанол, глюкоза) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 [3]. Встановлено, що максимальні показники синтезу спостерігалися в умовах росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші глюкози із гліцеролом.

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 [4] і поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 [2, 5]. 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.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідження особливостей метаболізму глюкози і гліцеролу в продуцента ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був виділений нами із забрудненого нафтою ґрунту штам *N. vaccinii* К-8, зареєстрований у депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номером IMB B-7405.

Штам *N. vaccinii* IMB B-7405 вирощували в рідкому мінеральному середовищі (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; дріжджовий автолізат – 0,5 (об'ємна частка). Як джерело вуглецю і енергії використовували глюкозу і гліцерол у концентрації 1% (масова та об'ємна частки, відповідно).

Як інокулянт використовували культуру в експоненційній фазі росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5% субстрату. Кількість посівного матеріалу (10^4 – 10^5 кл/мл) становила 5% від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці (220 об./хв) при 28–30 °С упродовж 24–32 год (до середини експоненційної фази росту).

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину після культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі із гліцеролом чи глюкозою, центрифугували (5000 г, 20 хв, 4 °С). Одержаний осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 г, 15 хв 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12 000 г, 30 хв, 4 °С), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ензимів катаболізму глюкози. Активність 6-фосфоглюкокінази (2.7.1.11) аналізували за швидкістю утворення фруктозо-1,6-дифосфату, а 6-фосфоглюконатдегідратази (4.2.1.12) – за швидкістю утворення пірувату, як описано нами раніше [6].

Активність глюкозодегідрогенази визначали за швидкістю утворення глюконо-1,5-лактону, який вимірювали спектрофотометрично з використанням глюкози як донора електронів за відновленням NAD(P)^+ , NAD^+ і NADP^+ при 340 нм (1.1.1.47 [7], 1.1.1.118 [8] і 1.1.1.119 [9] відповідно), дихлорфеноліндофенолу у присутності феназинметасульфату при 600 нм (1.1.5.2 [10]), дихлорфеноліндофенолу при 540 нм (1.1.5.9 [11]).

Активність глюконатдегідрогенази (1.1.1.215 [12] і 1.1.99.3 [13]) аналізували за швидкістю утворення 2-кетоглюконату, який визначали спектрофотометрично за відновленням NADP^+ при 340 нм і дихлорфеноліндофенолу при 540 нм відповідно з використанням глюконату натрію як донора електронів.

Активність глюкокінази (2.7.1.12) встановлювали за швидкістю утворення 6-фосфоглюконату, який вимірювали за відновленням NADP^+ при 340 нм у спряженій реакції з 6-фосфоглюконатдегідрогеназою [14].

Активність 6-фосфоглюконатдегідрогенази (1.1.1.44 [15], 1.1.1.351 [16] і 1.1.1.343 [17]) аналізували за швидкістю утворення рибулозо-5-фосфату, який визначали за відновленням NADP^+ , NAD(P)^+ і NAD^+ відповідно при 340 нм із використанням 6-фосфоглюконату натрію як донора електронів.

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (1.1.1.49 [18] і 1.1.1.363 [19]) встановлювали за відновленням NADP^+ і NAD(P)^+ відповідно при 340 нм з використанням глюкозо-6-фосфату як донора електронів.

Активність ензимів катаболізму гліцеролу визначали як описано нами раніше [5]. Активність NAD^+ -залежної гліцеролдегідрогенази (1.1.1.6), піролохінолінхінон (ПХХ)-залежної алкогольдегідрогенази (1.1.2.8) і ПХХ-залежної гліцеролдегідрогенази (1.1.99.22) аналізували спектрофотометрично за відновленням NAD^+ при 340 нм і дихлорфеноліндофенолу у присутності феназинметасульфату при 600 нм відповідно із гліцеролом як донором електронів, а нікотинопротеїнової NAD(P)H -вмісної алкогольдегідрогенази (або НДМА-залежна

алкогольдегідрогеназа, 1.1.99.36) також спектрофотометрично за відновленням 4-нітрозон,N-диметиланіліну (НДМА) при 440 нм із гліцеролом як донором електронів.

Активність дигідроксіацетонкінази (2.7.1.29) і гліцеролкінази (2.7.1.30) аналізували за утворенням дигідроксіацетонфосфату і гліцерол-3-фосфату відповідно, які визначали спектрофотометрично за окисненням (відновленням) NADH (NAD⁺) у спряженій реакції з гліцерол-3-фосфатдегідрогеназою.

Активність FAD⁺-залежної гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (1.1.5.3) встановлювали за відновленням 3-(4,5-диметилтриазоліл-2-)-2,5-дифенілтетразолію броміду у присутності феназинметасульфату при 570 нм із гліцерол-3-фосфатом як донором електронів.

Активність NAD⁺-залежної гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (1.1.1.8) аналізували спектрофотометрично за окисненням NADH при 340 нм із гліцерол-3-фосфатом як донором електронів.

Активність ензимів центрального метаболізму вивчали як описано раніше [20]. Так, активність ізоцитратліази (4.1.3.1) встановлювали за швидкістю утворення фенілгідразону гліюксилату при 324 нм, ізоцитратдегідрогенази (1.1.1.41), малатдегідрогенази (1.1.1.37) – за відновленням NAD⁺, а ізоцитратдегідрогенази (1.1.1.42), малатдегідрогенази (1.1.1.82) – за відновленням NADP⁺ при 340 у присутності ізоцитрату або малату відповідно, 2-оксоглутаратдегідрогенази (1.2.4.2) – за відновленням NAD⁺ при 340 нм у присутності 2-оксоглутарату та коензиму А. Активність піруваткарбоксілази (6.4.1.1) визначали за швидкістю утворення оксалоацетату і окисненням NADH при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою, фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (2.7.9.2) – за швидкістю утворення пірувату, яку аналізували за окисненням NADH при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксікінази (4.1.1.49) – за утворенням ФЕП та пірувату в процесі окиснення NADH, а глутаматдегідрогенази (1.4.1.4) – за утворенням глутамату під час окиснення NADPH при 340 нм, ФЕП-карбоксілази (4.1.1.31) – за окисненням NADH при 340 нм. Активність глутаматдегідрогенази (1.4.1.2), малатдегідрогенази (декарбоксілювальної) (1.1.1.38 і 1.1.1.40) встановлювали за віднов-

ленням NADH⁺ і NADP⁺ при 340 нм у присутності 2-оксоглутарату та малату відповідно.

Активність 2-оксоглутаратсинтази (1.2.7.3) встановлювали спектрофотометрично за відновленням метилвіологену при 578 нм і FAD⁺ при 450 нм із використанням 2-оксоглутарату як донора електронів [21].

Активність трегалозофосфатсинтази (2.4.1.15) [22] аналізували за утворенням уридиндифосфату, який визначали спектрофотометрично за окисненням NADH при 340 нм у спряжених реакціях із піруваткіназою і лактатдегідрогеназою.

Під час проведення ензиматичних аналізів використовували феназинметасульфат фірми Merck (Німеччина); метилвіологен – Acros Organics (США); NAD⁺, NADP⁺, уридин-5'-дифосфатглюкоза – Fluka (Швейцарія); дихлорфеноліндофенол, лактатдегідрогеназу, ADP, ізоцитрат, глюкозо-6-фосфат – Serva (Німеччина); решта – реактиви фірми Sigma (США).

Вміст протеїну в безклітинних екстрактах встановлювали за М. Bradford. Активність ензимів аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *N. vaccinii* IMB B-7405 і виражали в нмолях одержаного за 1 хв продукту реакції в перерахунку на 1 мг протеїну.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали як описано раніше [4, 5, 20]. Відмінності середніх показників вважали вірогідними на рівні значимості $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Метаболізм глюкози у *N. vaccinii* IMB B-7405. Станом на грудень 2014 р. у Кіотській енциклопедії геномів і геномів [KEGG, www.genome.jp/kegg/] наведено дані про секвенування геномів чотирьох штамів, які належать до роду *Nocardia*: *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*. Згідно з цією інформацією катаболізм глюкози в представників роду *Nocardia* здійснюється гліколітичним шляхом.

Наші дослідження показали, що в безклітинному екстракті, одержаному з вирощених на глюкозі клітин *N. vaccinii* IMB B-7405, не виявлено активність ключових ензимів гліколізу (6-фосфофруктокінази) і шляху Ент-

нера–Дудорова (6-фосфоглюконатдегідратази). Оскільки пентозофосфатний цикл не є основним шляхом катаболізму глюкози, а функціонує в усіх живих організмах, виконуючи життєво необхідні функції (синтез відновлювальних еквівалентів для процесів конструктивного метаболізму і рибози, необхідної для утворення нуклеїнових кислот), подальші дослідження було спрямовано на визначення активності різних глюкозодегідрогеназ, що беруть участь у розщепленні глюкози через глюконат (табл. 1).

Із літератури [9–11, 23] відомо, що окислення глюкози до глюконату у мікроорганізмів може здійснюватися NAD^+ , NADP^+ , NAD(P)^+ , ПХХ- і FAD^+ -залежними ензимами. Так, наприклад, NAD(P)^+ -залежні глюкозодегідрогенази функціонують у деяких архей, які окислюють глюкозу до глюконату за нефосфорильованим шляхом Ентнера–Дудорова [23]. ПХХ-залежні ензими виявлено в багатьох ентеробактерій, зокрема представників родів *Escherichia*, *Salmonella*, *Pantoea* [10], а також псевдомонад [24]. FAD^+ -залежні глюкозодегідрогенази було вперше виявлено у 1951 р. у *Aspergillus oryzae*, проте дотепер вони залишаються маловивченими [11]. Упродовж останнього десятиліття охарактеризовано FAD^+ -залежні дегідрогенази грибів *Aspergillus terreus*, *Penicillium lilacinoechinulatum*, *Glomerella cingulate* [11]. Інтерес до цих ензимів зумовлений їх використанням для ство-

рення глюкозних біосенсорів. Зазначимо, що дотепер відомості про функціонування FAD^+ -залежних глюкозодегідрогеназ у прокариот є дуже обмеженими. Так, найвивченішою (і практично єдиною) бактеріальною FAD^+ -залежною глюкозодегідрогеназою є ензим грамнегативних бактерій *Burkholderia cepacia* [25–27]. У базі даних BRENDA [www.brenda-enzymes.info/] є посилання на роботи 60–80 років ХХ ст. про функціонування цього ензиму у *Pseudomonas* sp. і *Acinetobacter baumannii* [28, 29]. Пошук інформації щодо подальшого дослідження цієї дегідрогенази в представників роду *Pseudomonas* і *Acinetobacter* не дав результату. Згідно з даними KEGG у бактерій цих родів функціонує ПХХ-залежна глюкозодегідрогеназа, а FAD^+ -залежний ензим відсутній.

Слід зазначити, що в представників роду *Nocardia*, інформація про які наявна в KEGG, не виявлено жодної із глюкозодегідрогеназ (як NAD^+ , NADP^+ , NAD(P)^+ , ПХХ-, так і FAD^+ -залежних).

Наші дослідження показали, що в клітинах *N. vaccinii* ІМВ В-7405 окислення глюкози до глюконату здійснюється за участю FAD^+ -залежної глюкозодегідрогенази (табл. 1). Таким чином, одержані нами результати доповнюють нечисленні дані літератури про функціонування FAD^+ -залежної глюкозодегідрогенази в прокариот, а також, можливо, є першим

Таблиця 1. Активність ензимів катаболізму глюкози (розщеплення через глюконат) у *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Етап	Ензим	Шифр	Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ протеїну
Окислення глюкози до глюконату	NAD(P)^+ -залежна глюкозодегідрогеназа	1.1.1.47	7,0 ± 0,3
	NAD^+ -залежна глюкозодегідрогеназа	1.1.1.118	0
	NADP^+ -залежна глюкозодегідрогеназа	1.1.1.119	5,0 ± 0,2
	ПХХ-залежна глюкозодегідрогеназа	1.1.5.2	0
	FAD^+ -залежна глюкозодегідрогеназа	1.1.5.9	698 ± 35
Залучення глюконату до метаболізму	NADP^+ -залежна глюконатдегідрогеназа	1.1.1.215	0
	FAD^+ -залежна глюконатдегідрогеназа	1.1.99.3	0
	Глюконокіназа	2.7.1.12	178 ± 9
Залучення 6-фосфоглюконату до метаболізму	6-фосфоглюконатдегідратаза	4.2.1.12	0
	NADP^+ -залежна 6-фосфоглюконатдегідрогеназа	1.1.1.44	357 ± 17
	NAD(P)^+ -залежна 6-фосфоглюконатдегідрогеназа	1.1.1.351	0
	NAD^+ -залежна 6-фосфоглюконатдегідрогеназа	1.1.1.343	6,0 ± 0,3

свідченням наявності цього ензиму у грампозитивних бактерій, зокрема представників роду *Nocardia*.

Залучення глюконату, утвореного під час окислення глюкози, до подальшого метаболізму здійснюють глюконатдегідрогенази або глюконокіназа [12–14]. Наші дослідження показали, що у *N. vaccinii* IMB B-7405 утворення 6-фосфоглюконату каталізується глюконокіназою (табл. 1). Згідно з даними KEGG цей ензим виявлено в представників роду *Nocardia*, хоча шляхи утворення глюконату із глюкози в цих бактеріях дотепер залишаються невідомими.

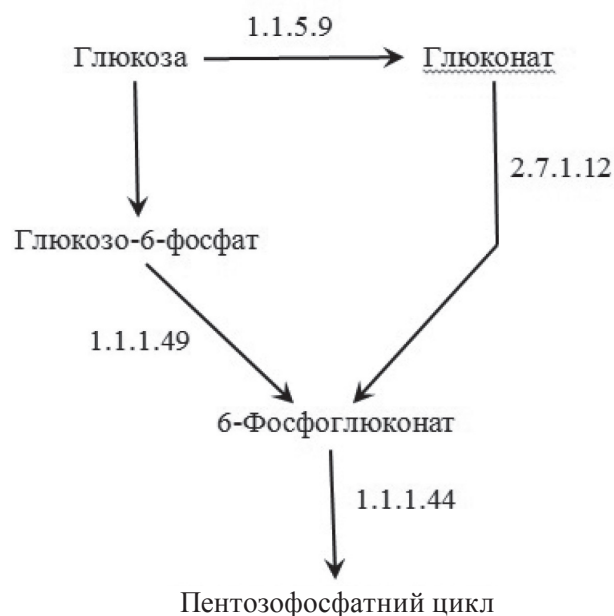
Утворений в глюконатдегідрогеназній або глюконокіназній реакції 6-фосфоглюконат далі може метаболізуватися або через шлях Ентнера–Дудорова за участю 6-фосфоглюконатдегідратази, або через пентозофосфатний цикл за участю 6-фосфоглюконатдегідрогеназ [30, 31]. Дотепер відомі 6-фосфоглюконатдегідрогенази двох типів: конститутивні (NAD(P)^+ - і NADP^+ -залежні) – беруть участь в окислювальній гілці пентозофосфатного циклу, забезпечуючи синтез відновлювальних еквівалентів і рибози для біосинтетичних процесів, і індукцйбельні (NAD^+ -залежні) – функціонують в альтернативному шляху залучення 6-фосфоглюконату до метаболізму [30, 31].

У безклітинному екстракті *N. vaccinii* IMB B-7405, одержаному із клітин, вирощених на глюкозі, активність індукцйбельної NAD^+ -залежної 6-фосфоглюконатдегідрогенази була дуже низькою (близько $6 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну), в той час як активність NAD(P)^+ -залежного конститутивного ензиму досягала $357 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну (табл. 1). Таким чином, у штаму IMB B-7405 пентозофосфатний цикл також бере участь у катаболізмі глюкози. Для підтвердження цього аналізували активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – одного з ензимів пентозофосфатного циклу [18, 19]. Експерименти показали, що у *N. vaccinii* IMB B-7405 функціонує NAD^+ -залежна глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (активність $835 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну), в той час як активність NADP^+ -залежного ензиму не реєструвалася.

Таким чином, катаболізм глюкози у *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснюється як за пентозофосфатним циклом, так і розщепленням через глюконат із подальшим залученням

6-фосфоглюконату в пентозофосфатний цикл. Гіпотетичну схему катаболізму глюкози в досліджуваного нами штаму IMB B-7405 наведено на рисунку.

Шляхи метаболізму гліцеролу у N. vaccinii IMB B-7405. У нашій попередній роботі [5] ми зазначали, що в мікроорганізмів, які використовують гліцерол як джерело вуглецю і енергії, цей субстрат асимілюється двома шляхами. Перший шлях починається з АТР-залежного фосфорилування гліцеролу (ензим гліцеролкіназа) з утворенням гліцерол-3-фосфату, який в подальшому окислюється до дигідроксіацетонфосфату за участю гліцерол-3-фосфатдегідрогеназ або гліцерол-3-фосфатоксидаз (гліцерол-3-фосфатний шлях). Другий шлях катаболізму починається окисленням гліцеролу до дигідроксіацетону за участю гліцерол- або алкогольдегідрогеназ (NAD^+ -, ПХХ- та НДМА-залежних). Утворений дигідроксіацетон далі фосфорилується до дигідроксіацетонфосфату за участю дигідроксіацетонкінази (дигідроксіацетоновий



Гіпотетична схема катаболізму глюкози у N. vaccinii IMB B-7405. Ензими: 1.1.5.9 – FAD^+ -залежна глюкоздегідрогеназа; 2.7.1.12 – глюконокіназа; 1.1.1.49 – NADP^+ -залежна глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 1.1.1.44 – NADP^+ -залежна 6-фосфоглюконатдегідрогеназа

шлях). Дигідроксіацетонфосфат є інтермедіатом гліколізу і далі метаболізується за цим шляхом.

Наші експерименти показали, що у *N. vaccinii* IMB B-7405 катаболізм гліцеролу до дигідроксіацетонфосфату може здійснюватися двома шляхами: через гліцерол-3-фосфат (активність гліцеролкінази 244 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) і через дигідроксіацетон (активність дигідроксіацетонкінази 732 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) (табл. 2). Окислення гліцеролу до дигідроксіацетону в клітинах штаму IMB B-7405 каталізується ПХХ-залежною гліцеролдегідрогеназою і НДМА-залежною алкогольдегідрогеназою (табл. 2).

Залучення 2-оксоглутарату до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) і анаплеротичні реакції. У табл. 3 наведено активність деяких ензимів ЦТК в клітинах штаму IMB B-7405, вирощених на гліцеролі і глюкозі. Виявилось неочікуваним, що під час росту *N. vaccinii* IMB B-7405 як на гліцеролі, так і на глюкозі в клітинах бактерій не виявлялася активність ключового ензиму ЦТК – 2-оксоглутаратдегідрогенази, хоча в той самий час виявлено NAD⁺- і NADP⁺-залежну малатдегідрогеназну активність – наступних ензимів циклу трикарбонових кислот (табл. 3).

Зазначимо, що у процесі культивування мікроорганізмів на неуглеводних субстратах утворення сукцинату може відбуватися в гліоксилатному циклі, ключовим ензимом якого є ізоцитратліаза [4]. Проте наступні дослідження показали, що за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на обох досліджуваних субстратах у клітинах бактерій цей ензим не функціонує, а анапле-

ротичною реакцією, що поповнює вміст пулу С₄-дикарбонових кислот, є ФЕП-карбоксилазна реакція (табл. 3).

Водночас в літературі є повідомлення щодо альтернативних шляхів залучення 2-оксоглутарату до ЦТК (перетворення 2-оксоглутарату на сукцинат) у мікроорганізмів [21, 32, 33]. Так, у представників роду *Rhizobium* 2-оксоглутарат, утворюваний в ізоцитратдегідрогеназній реакції ЦТК, за участю 2-оксоглутаратдекарбоксилази перетворюється на сукцинат-напівальдегід, який в наступній NAD(P)⁺-залежній дегідрогеназній реакції відновлюється до сукцинату [32]. В інших мікроорганізмів (наприклад, бактерій *Hydrogenobacter thermophiles*) сукцинат утворюється з 2-оксоглутарату у 2-оксоглутаратсинтазній реакції [21, 33]. В KEGG є інформація про наявність цього ензиму в деяких представників роду *Nocardia*.

Наші подальші експерименти показали, що в клітинах штаму IMB B-7405 2-оксоглутарат залучається до ЦТК за участю 2-оксоглутаратсинтази (табл. 3).

Біосинтез поверхнево-активних речовин. У попередніх дослідженнях [34] було встановлено, що за хімічним складом ПАР, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 на гліцеролі, є комплексом нейтральних, гліко- і аміноліпідів, причому гліколіпіди представлені трегалозоміколатами. У табл. 3 наведено дані про активність ензимів біосинтезу ПАР у клітинах штаму IMB B-7405, вирощених на гліцеролі та глюкозі. Ензиматичні дослідження підтвердили здатність *N. vaccinii* IMB B-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів, про що засвідчила висо-

Таблиця 2. Активність ензимів катаболізму гліцеролу у *N. vaccinii* IMB B-7405

Шлях катаболізму	Ензим	Шифр	Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ протеїну
Дигідроксіацетонний	ПХХ-залежна гліцеролдегідрогеназа	1.1.99.22	256 ± 13
	НДМА-залежна алкогольдегідрогеназа	1.1.99.36	550 ± 28
	Дигідроксіацетонкіназа	2.7.1.29	732 ± 37
	NAD ⁺ -залежна гліцеролдегідрогеназа	1.1.1.6	0
	ПХХ-залежна алкогольдегідрогеназа	1.1.2.8	0
Гліцерол-3-фосфатний	Гліцеролкіназа	2.7.1.30	244 ± 12
	NAD ⁺ -залежна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа	1.1.1.8	488 ± 24
	FAD ⁺ -залежна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа	1.1.5.3	0

Таблиця 3. Активність ензимів центрального метаболізму в клітинах *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Етап метаболізму	Ензим	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ протеїну) в безклітинних екстрактах, одержаних із клітин, вирощених на	
		гліцеролі	глюкозі
Цикл трикарбонових кислот	NAD ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	0	0
	NADP ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	328±16	128±6
	2-Оксоглутаратдегідрогеназа	0	0
	2-Оксоглутаратсинтаза*	169 ± 8 (102 ± 5)	127 ± 6 (87 ± 4)
	NAD ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	239 ± 11	321 ± 16
	NADP ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	567 ± 28	1600 ± 80
Анаплеротичні реакції	Ізоцитратліаза	0	0
	Фосфоенолпіруваткарбоксилаза	714 ± 35	803 ± 40
	Піруваткарбоксилаза	10,0 ± 0,5	14,0 ± 0,7
	NAD ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	0	0
	NADP ⁺ -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	15,0 ± 0,7	12±0,6
Біосинтез ПАР	Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа	820 ± 41	201 ± 10
	Фосфоенолпіруватсинтетаза	1071 ± 53	602 ± 30
	Трегалозофосфатсинтаза	42 ± 2	32 ± 1
	NADP ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	357 ± 17	402 ± 20
	NAD ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	0	0

* У дужках наведено активність 2-оксоглутаратсинтази з використанням FAD⁺ як донора електронів.

ка активність ензимів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикіназа та ФЕП-синтетаза) і NADP⁺-залежної глутаматдегідрогенази, а також активність трегалозофосфатсинтази – ключового ензиму біосинтезу трегалозоміколатів.

Отже, внаслідок проведеної роботи визначено шляхи катаболізму глюкози і гліцеролу, а та-

кож активність ключових ензимів ЦТК, анаплеротичних і біосинтетичних шляхів у *N. vaccinii* ІМВ В-7405. Одержані дані є вихідними для здійснення теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрації монособстратів у суміші з метою інтенсифікації синтезу ПАР.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И ГЛИЦЕРОЛА У *Nocardia vaccinii* IMB B-7405

Т. П. Пирог^{1,2}, Т. А. Шевчук¹,
К. А. Береговая², Н. В. Кудря²

¹Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;

²Национальный университет пищевых
технологий, Киев, Украина;
e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Установлено, что глюкоза у продуцента поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 ассимилируется в пентозофосфатном цикле, а также при расщеплении через глюконат (активность NAD⁺-зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и FAD⁺-зависимой глюкоздегидрогеназы 835 ± 41 и 698 ± 35 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ протеина соответственно). Образующийся в глюконокиназной реакции 6-фосфоглюконат вовлекается в пентозофосфатный цикл (активность конститутивной NADP⁺-зависимой 6-фосфоглюконатдегидрогеназы 357 ± 17 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ протеина). Катаболизм глицерола до дигидроксиацетонфосфата (интермедиат гликолиза) может осуществляться двумя путями: через глицерол-3-фосфат (активность глицеролкиназы 244 ± 12 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ протеина) и дигидроксиацетон. Восполнение пула C₄-дикарбоновых кислот в клетках штамма IMB B-7405, растущего как на глюкозе, так и глицероле, происходит в фосфоэнолпируват(ФЕП)-карбоксилазной реакции ($714-803$ нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ протеина). Вовлечение 2-оксоглутарата в цикл трикарбоновых кислот осуществляется альтернативным путем при участии 2-оксоглутаратсинтазы. Обнаруженная активность обоих ключевых ферментов глюконеогенеза (ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-синтазы), трегалозофосфатсинтазы и NADP⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы подтвердила способность штамма IMB B-7405 к синтезу поверхностно-активных глико- и аминоклиперидов соответственно.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, катаболизм глюкозы и глицерола, ключевые ферменты, активность ферментов, анаплеротические реакции, биосинтез.

PECULIARITIES OF GLUCOSE AND GLYCEROL METABOLISM IN *Nocardia vaccinii* IMB B-7405

T. P. Pirog^{1,2}, T. A. Shevchuk¹, K. A. Beregova²,
N. V. Kudrya²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²National University of Food
Technologies, Kyiv, Ukraine;
e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

It has been established that in cells of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 (surfactant producer) glucose catabolism is performed through pentose phosphate cycle as well as through gluconate (activity of NAD⁺-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase and FAD⁺-dependent glucose dehydrogenase 835 ± 41 and 698 ± 35 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein respectively). 6-Phosphogluconate formed in the gluconokinase reaction is involved in the pentose phosphate cycle (activity of constitutive NADP⁺-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase 357 ± 17 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein). Glycerol catabolism to dihydroxyacetonephosphate (the intermediate of glycolysis) may be performed in two ways: through glycerol-3-phosphate (glycerol kinase activity 244 ± 12 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein) and through dihydroxyacetone. Replenishment of the C₄-dicarboxylic acids pool in *N. vaccinii* IMB B-7405 grown on glucose and glycerol occurs in the phosphoenolpyruvate(PEP)carboxylase reaction ($714-803$ nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein). 2-Oxoglutarate was involved in tricarboxylic acid cycle by alternate pathway with the participation of 2-oxoglutarate synthase.

The observed activity of both key enzymes of gluconeogenesis (PEP-carboxykinase and PEP-synthase), trehalose phosphate synthase and NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase confirmed the ability of IMB B-7405 strain to the synthesis of surface active glyco- and aminolipids, respectively.

Key words: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, catabolism of glucose and glycerol, key enzymes, activity of enzymes, anaplerotic reactions, biosynthesis.

References

1. Marchant R., Banat M. I. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants. *Biotechnol. Lett.* 2012;34(9):1597-1605.
2. Pirog T. P., Shulyakova M. A., Shevchuk T. A. Mixed substrates in environment and biotechnological processes. *Biotechnologia Acta.* 2013;6(6):28-44. (In Ukrainian).
3. Kudrya N., Pirog T. The specifics of surfactants synthesis during *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 cultivation on mixed substrates. *Ukr. Food J.* 2013;2(2):203-209. (In Ukrainian).
4. Pidhorskyi V., Iutinska G., Pirog T. Intensification of microbial synthesis technologies. K.: Nauk. Dumka, 2010; 327 p. (In Ukrainian).
5. Pirog T. P., Konon A. D., Shevchuk T. A., Bilets I. V. Intensification of biosurfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on a hexadecane-glycerol mixture. *Microbiology.* 2012;81(5):565-572.
6. Pirog T. P., Kuzminska Yu. V., Kovalenko M. A. Metabolism C₂-C₆-substrates under mixotrophic growth *Acinetobacter* sp. B-7005 and B-7005(1 HГ) strains. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(1):33-38. (In Ukrainian).
7. Milburn C. C., Lamble H. J., Theodossis A., Bull S. D., Hough D. W., Danson M. J., Taylor G. L. The structural basis of substrate promiscuity in glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* 2006;281(21):14796-14804.
8. Nishiya Y., Tamura N., Tamura T. Analysis of bacterial glucose dehydrogenase homologs from thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*: finding and characterization of aldohexose dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004;68(12):2451-2456.
9. Avigad G., Alroy Y., England S. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked aldohexose dehydrogenase from *Gluconobacter cerinus*. *J. Biol. Chem.* 1968;243(8):1936-1941.
10. Andreeva I. G., Golubeva L. I., Kuvaeva T. M., Gak E. R., Katashkina J. I., Mashko S. V. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and pqqABCDEF operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011;318(1):55-60.
11. Sygmund C., Staudigl P., Klausberger M., Pinotsis N., Djinović-Carugo K., Gorton L., Haltrich D., Ludwig R. Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 2011;10:106. doi: 10.1186/1475-2859-10-106.
12. Chiyonobu T., Shinagawa E., Adachi O., Ameyama M. Purification, crystallization and properties of 2-ketogluconate reductase from *Acetobacter rancens*. *Agric. Biol. Chem.* 1976;40(1):175-184.
13. Yum D. Y., Lee Y. P., Pan J. G. Cloning and expression of a gene cluster encoding three subunits of membrane-bound gluconate dehydrogenase from *Erwinia cypripedii* ATCC 29267 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1997;179(21):6566-6572.
14. Izu H., Adachi O., Yamada M. Purification and characterization of the *Escherichia coli* thermoresistant gluconokinase encoded by the gntK gene. *FEBS Lett.* 1996;394(1):14-16.
15. Bridges R. B., Palumbo M. P., Wittenberger C. L. Purification and properties of an NADP-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 1975;250(15):6093-6100.
16. Stournaras C., Maurer P., Kurz G. 6-phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. Properties and subunit structure. *Eur. J. Biochem.* 1983;130(2):391-396.
17. Ohara H., Uchida K., Yahata M., Kondo H. NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase in lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1996;60(4):692-693.
18. Olavarría K., Valdés D., Cabrera R. The cofactor preference of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* – modeling the physiological production of reduced cofactors. *FEBS J.* 2012;279(13):2296-2309. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08610.x.
19. Lee W. T., Levy H. R. Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction. *Protein Sci.* 1992;1(3):329-334.
20. 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;77(6):665-673.
21. Yun N. R., Arai H., Ishii M., Igarashi Y. The genes for anabolic 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;282(2):589-594.
 22. Pan Y. T., Carroll J. D., Elbein A. D. Trehalose-phosphate synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(24):6091-6100.
 23. Milburn C. C., Lambell H. J., Theodossis A., Bull S. D., Hough D. W., Danson M. J., Taylor G. L. The structural basis of substrate promiscuity in glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* 2006;281(21):14796-14804.
 24. Buch A., Archana G., Naresh Kumar G. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res. Microbiol.* 2008;159(9-10):635-642.
 25. Yamaoka H., Yamashita Y., Ferri S., Sode K. Site directed mutagenesis studies of FAD-dependent glucose dehydrogenase catalytic subunit of *Burkholderia cepacia*. *Biotechnol. Lett.* 2008;30(11):1967-1972. doi: 10.1007/s10529-008-9777-3.
 26. Yamashita Y., Ferri S., Huynh M. L., Shimizu H., Yamaoka H., Sode K. Direct electron transfer type disposable sensor strip for glucose sensing employing an engineered FAD glucose dehydrogenase. *Enzyme Microb. Technol.* 2013;52(2):123-128. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.11.002.
 27. Fapyane D., Lee S. J., Kang S. H., Lim D. H., Cho K. K., Nam T. H., Ahn J. P., Ahn J. H., Kim S. W., Chang I. S. High performance enzyme fuel cells using a genetically expressed FAD-dependent glucose dehydrogenase α -subunit of *Burkholderia cepacia* immobilized in a carbon nanotube electrode for low glucose conditions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013;15(24):9508-9512. doi: 10.1039/c3cp51864g.
 28. Matsushita K., Ohno Y., Shinagawa E., Adachi O., Ameyama M. Membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas* sp.: solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 1980;44(7):1505-1512.
 29. Hauge J. G. Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. *J. Biol. Chem.* 1964;239(11):3630-3639.
 30. Lessie T. G., Phibbs P. V. Jr. Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu. Rev. Microbiol.* 1984;38:359-388.
 31. Wang I. N., Dykhuizen D. E. Variation of enzyme activities at a branched pathway involved in the utilization of gluconate in *Escherichia coli*. *Evolution*. 2001;55(5):897-908.
 32. Aoshima M. Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;75(2):249-255.
 33. Yamamoto M., Ikeda T., Arai H., Ishii M., Igarashi Y. Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophiles*. *Extremophiles*. 2010;14(1):79-85. doi: 10.1007/s00792-009-0289-4.
 34. Pirog T., Gritsenko N., Khomyak D., Konon A., Antonuk S. Optimization of synthesis of biosurfactants of *Nocardia vaccinii* K-8 under bioconversion of biodiesel production waste. *Microbiol. J.* 2011;73(4):15-24. (In Russian).

Отримано 26.11.2014