

**ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
ТРЕГАЛОЗОМІКОЛАТІВ *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1**

Встановлено, що під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на середовищі з *n*-гексадеканом активність трегалозофосфатсинтази (ключового ферменту синтезу трегалозоміколатів) була у 10, а кількість синтезованих поверхнево-активних речовин у 4 рази вищими порівняно з вирощуванням штаму ЕК-1 на етанолі.

Внесення 0,2 % фумарату і 0,1 % цитрату у середовище культивування *R. erythropolis* ЕК-1 з 2 % *n*-гексадекану, а також 0,2 % фумарату у середовище з 2 % етанолу супроводжувалося інтенсифікацією синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів, про що засвідчило підвищення у 1,3–1,6 рази за таких умов кількості синтезованих поверхнево-активних речовин і збільшення у 3–5 разів активності фосфоенолпіруватсинтази (ключового ферменту глікогенезу) і трегалозофосфатсинтази.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis*, трегалозоміколати, трегалозофосфатсинтаза, інтенсифікація синтезу.

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту і води виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [5]. Встановлено здатність штаму ЕК-1 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на гідрофільних (глюкоза, етанол) та гідрофобних (рідкі парафіни, *n*-гексадекан) субстратах. Порівняно з відомими продуцентами поверхнево-активних речовин (ПАР) штаму ЕК-1 має такі переваги: синтезує ПАР на середовищі з низьким вмістом солей (3 г/л), не потребує факторів росту, характеризується високим виходом ПАР від субстрату (до 70 %) [2]. Показано, що *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР, які за хімічною природою являють собою комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів із сполуками полісахаридно-білкової природи [2, 5]. Гліколіпіди представлені трегалозомоно- і диміколатами, фосфоліпіди – фосфатидилгліцирином, фосфатидилетаноламіном, дифосфатидилгліцирином, нейтральні ліпіди – цетиловим спиртом, пальмітиновою кислотою, метиловим ефіром *n*-пентадеканової кислоти, тригліциридами, міколовими кислотами та ін. Слід зазначити, що основними компонентами ПАР *R. erythropolis* ЕК-1, як і ПАР інших представників роду *Rhodococcus* [9], є гліколіпіди трегалозомоно- і диміколати.

У попередніх дослідженнях нами була показана можливість підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за умови внесення у середовище з етанолом або *n*-гексадеканом C_4 -дикарбонових кислот (попередників глікогенезу) і цитрату (регулятора синтезу ліпідів) [3, 4]. За одночасної присутності у середовищі культивування фумарату і цитрату спостерігали збільшення на 40–100 % кількості синтезованих ПАР, умовної концентрації ПАР та індексу емульгування. Проте на сьогодні залишається недослідженим питання, синтез яких саме компонентів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 підвищується за присутності у середовищі культивування екзогенних фумарату і цитрату.

Мета даної роботи – дослідити особливості утворення трегалозоміколатів за різних умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі і *n*-гексадекані. Для досягнення цієї мети аналізували активність ключових ферментів, які беруть участь у синтезі цих гліколіпідів – фосфоенолпіруватсинтази (ФЕП-синтази), ФЕП-карбоксикінази та трегалозофосфатсинтази.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ під номером ІМВ Ас-5017.

Культивування *R. erythropolis* ЕК-1. Бактерії вирощували на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л), середовище 1: $NaNO_3$ – 1,3; $NaCl$ – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001; рН 6,8–7,0; середовище 2: KH_2PO_4 – 6,8; $NaOH$ – 1,0; NH_4NO_3 – 0,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,1; $FeCl_3 \times 6H_2O$ – 0,001; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовували *n*-гексадекан і етанол у концентрації 1 і 2 %

(об'ємна частка). Як попередники синтезу ПАР використовували цитрат натрію і фумарат натрію у концентрації 0,1 і 0,2 % (масова частка) відповідно. Цитрат і фумарат вносили у середовище на початку стаціонарної фази росту. Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48–72 год), вирощену на середовищах наведеного вище складу з 0,3 % *n*-гексадекану або 0,5 % етанолу.

Вирощування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 48–168 год.

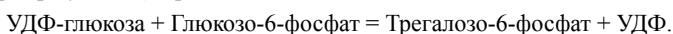
Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР*), індекс емульгування (E_{24}) розбавленої у 50 разів культуральної рідини, а також кількість синтезованих ПАР, які визначали як описано у працях [2–5].

Одержання безклітинних екстрактів. Культуральну рідину, одержану після культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому середовищі з *n*-гексадеканом, обробляли гексаном для видалення залишків *n*-гексадекану, після чого відділяли клітини бактерій фільтруванням під вакуумом. Осад клітин на паперовому фільтрі послідовно (під вакуумом) промивали гексаном і 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 4 рази по 60 с при температурі 4°C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4°C), осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Ензиматичні аналізи. Активність ФЕП-синтетази (систематична назва ферменту – піруват, вода дикіназа; КФ 2.7.9.2) [7] аналізували за швидкістю утворення пірувату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою. Активність фосфоенолпіруватсинтетази аналізували також колориметрично за зниженням концентрації пірувату в реакційній суміші (реакція з динітрофенілгідразинном) при 445 нм [7].

Активність ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) [8] встановлювали спектрофотометрично за окисненням НАДН при 340 нм.

Активність трегалозофосфатсинтази (КФ 2.4.1.15) [10] визначали за утворенням урідиндифосфату (УДФ) в реакції:



УДФ аналізували спектрофотометрично за окисненням НАДН при 340 нм у спряжених реакціях утворення пірувату з ФЕП за участю піруваткінази і утворення лактату з пірувату за участю лактатдегідрогенази.

Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [6]. Активність ферментів аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *R. erythropolis* ЕК-1.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакінім [1]. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно з *t*-критерієм Стьюдента при 5%-му рівні значимості.

Результати та їх обговорення. У процесі асиміляції мікроорганізмами дво- або трьохвуглецевих субстратів або субстратів, катаболізм яких проходить через ацетил-КоА чи інтермедіати циклу трикарбонових кислот, виникає необхідність синтезу молекул вуглеводів. Ці перетворення здійснюються шляхом глюконеогенезу. Ензиматичні дослідження показали, що під час росту на етанолі і *n*-гексадекані у *R. erythropolis* ЕК-1 в утворенні фосфоенолпірувату беруть участь обидва ключові ферменти глюконеогенезу – ФЕП-синтетаза і ФЕП-карбоксикіназа (табл. 1).

Цікаво зазначити, що за умов росту штаму ЕК-1 на етанолі спостерігали високу активність обох ключових ферментів глюконеогенезу, тоді як у процесі вирощування на *n*-гексадекані у *R. erythropolis* ЕК-1 функціонує переважно лише ФЕП-синтетаза (табл. 1). Під час культивування штаму ЕК-1 на обох субстратах виявлено активність трегалозофосфатсинтази, проте за умов росту на етанолі активність цього ферменту була у 10 разів нижчою, ніж на середовищі з *n*-гексадеканом. Ми вважаємо, що це явище можна пояснити тим, що трегалозоміколати полегшують споживання гідрофобних субстратів і зазвичай містяться у великій кількості у клітинних стінках мікроорганізмів, які ростуть на парафінах, нафті, гексадекані тощо.

**Активність ферментів глюконеогенезу за умов росту
R. erythropolis ЕК-1 на етанолі і *n*-гексадекані**

Фермент	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) під час росту на	
	Етанолі	Гексадекані
ФЕП-синтетаза	556±26	943±45
ФЕП-карбоксиказа	603±28	50±3
Трегалозофосфатсинтаза	66±3	679±31

Примітки. За використання етанолу як джерела вуглецю культивування штаму ЕК-1 здійснювали на середовищі 2, а *n*-гексадекану – на середовищі 1. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, які перебували на початку стаціонарної фази росту.

Показники синтезу поверхнево-активних речовин, а також активність ФЕП-синтетази і трегалозофосфатсинтази під час росту штаму ЕК-1 на середовищі з *n*-гексадеканом за присутності fumarату і цитрату наведено у табл. 2. Як видно з наведених у табл. 2 даних, після внесення у середовище з *n*-гексадеканом fumarату і цитрату активність трегалозофосфатсинтази підвищувалась у 3–5 разів порівняно з такою при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі без цих попередників, у той час як активність ФЕП-синтетази збільшувалась лише за одночасного внесення у середовище обох попередників. Цілком ймовірно, що за присутності тільки цитрату, або лише fumarату підвищення активності трегалозофосфатсинтази може корелювати із збільшенням активності іншого ключового ферменту глюконеогенезу – ФЕП-карбоксикази. З'ясуванню цього питання будуть присвячені наші подальші дослідження.

Результати, наведені у табл. 2, свідчать про те, що підвищення показників синтезу ПАР за внесення у середовище з *n*-гексадеканом fumarату і цитрату зумовлене посиленням синтезу трегалозоміколатів у таких умовах культивування штаму ЕК-1.

Таблиця 2

**Утворення ПАР і активність деяких ферментів синтезу трегалозоміколатів
під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на *n*-гексадекані
за присутності fumarату і цитрату**

Попередники	ПАР*	ПАР, г/л	E ₂₄ , %	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)	
				ФЕП-синтетази	Трегалозо-фосфатсинтази
Без попередників	4,5±0,22	4,0±0,20	51±2	943±45	679±31
Цитрат, 0,1 %	4,8±0,24	4,2±0,21	78±3	485±24	1980±94
Фумарат, 0,2 %	5,8±0,29	4,9±0,24	57±2	467±23	1768±82
Цитрат, 0,1 % + фумарат, 0,2 %	6,0±0,29	6,4±0,30	63±3	3356±156	3267±160

Примітки. Культивування здійснювали на середовищі 1. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, які перебували у стаціонарній фазі росту.

У процесі росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі за присутності фумарату і цитрату характер зміни активності досліджуваних ферментів відрізнявся від такого на *n*-гексадекані (табл. 3). Так, за наявності у середовищі з етанолом фумарату і цитрату (окремо і разом) спостерігали зниження у 1,5–2,5 рази активності ФЕП-карбоксикинази і підвищення у 2,5–3,6 рази активності ФЕП-синтетази порівняно з культивуванням штаму на середовищі без попередників біосинтезу ПАР. Активність трегалозофосфатсинтази підвищувалася лише за внесення у етанолвмісне середовище фумарату. За присутності цитрату, а також фумарату і цитрату, активність цього ферменту була дещо нижчою, ніж за умов росту на етанолі (44–57 і 66 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка відповідно).

Отже, під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі за присутності цитрату зниження показників ПАР* і ПАР (г/л) корелювало із зменшенням активності трегалозофосфатсинтази (табл. 3), що свідчить про зниження синтезу трегалозоміколатів. Підвищення показника E_{24} і активності ФЕП-синтетази може свідчити про посилення за таких умов синтезу емульгатора вуглеводної природи. За присутності фумарату підвищення значень ПАР* і ПАР (г/л) корелювало із збільшенням активності трегалозофосфатсинтази і ФЕП-синтетази (табл. 3), що може свідчити про посилення синтезу трегалозоміколатів. За одночасного внесення в етанолвмісне середовище фумарату і цитрату підвищення всіх показників синтезу ПАР зумовлене, очевидно, збільшенням синтезу емульгатора вуглеводної природи і поверхнево-активних гліколіпідів, проте не трегалозоміколатів. Про це свідчило підвищення за таких умов активності обох ферментів глюконеогенезу і зниження активності трегалозофосфатсинтази.

Таблиця 3

Вплив фумарату і цитрату на утворення ПАР і активність ферментів біосинтезу трегалозоміколатів під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі

Попередники	ПАР*	ПАР, г/л	E_{24} , %	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)		
				ФЕП- карбокси- кинази	ФЕП- синтетази	Трегалозо- фосфатсинтази
Без попередників	3,0±0,15	0,9±0,04	60±2	603±28	556±26	66±3
Цитрат, 0,1 %	3,0±0,15	0,8±0,04	90±4	238±11	1300±60	44±2
Фумарат, 0,2 %	4,2±0,21	1,4±0,07	75±3	292±14	1500±75	150±7
Цитрат, 0,1 % + фумарат, 0,2 %	4,8±0,24	1,9±0,09	80±4	367±17	1980±93	57±2

Примітки. Культивування здійснювали на середовищі 2. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, які перебували у стаціонарній фазі росту.

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що за присутності попередників біосинтезу ПАР (фумарату і цитрату) у середовищі з *n*-гексадеканом підвищення показників утворення цих сполук штамом *R. erythropolis* ЕК-1 зумовлене посиленням синтезу трегалозоміколатів. За умов росту бактерій на етанолі інтенсифікація утворення трегалозоміколатів спостерігалась лише за внесення у середовище фумарату.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТИ-АКТИВНЫХ ТРЕГАЛОЗОМИКОЛАТОВ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1

Резюме

Установлено, что при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на среде с *n*-гексадеканом активность трегалозофосфатсинтазы (ключевого фермента синтеза трегалозомиколатов) была в 10, а количество синтезированных поверхностно-активных веществ в 4 раза выше по сравнению с выращиванием штамма ЭК-1 на этаноле.

Внесение 0,2 % фумарата и 0,1 % цитрата в среду культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 с 2 % *n*-гексадекана, а также 0,2 % фумарата в среду с 2 % этанола сопровождалось интенсификацией синтеза поверхностно-активных трегалозомиколатов, о чем свидетельствовало повышение в 1,3–1,6 раза в таких условиях количества синтезированных поверхностно-активных веществ и увеличение в 3–5 раз активности фосфоенолпируватсинтазы (ключевого фермента глюконеогенеза) и трегалозофосфатсинтазы.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, трегалозомиколаты, трегалозофосфатсинтаза, интенсификация синтеза.

T.P.Pirog, T.A.Shevchuk, Yu.A.Klimenko

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

PECULIARITIES OF SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE TREHALOSEMYCOLATES OF *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* EK-1

S u m m a r y

It has been established that activity of trehalosephosphate synthase (key enzyme of trehalosemycolates synthesis) under cultivation of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on the medium with *n*-hexadecane was 10 times higher, and amount of synthesized surface-active substances 4 times higher as compared to the growing of EK-1 strain on ethanol.

Introduction of 0.2 % of fumarate and 0.1 % of citrate to the cultivation medium of *R. erythropolis* EK-1 with 2 % of *n*-hexadecane, as well as 0.2 % of fumarate to the medium with 2 % of ethanol was accompanied by intensification of synthesis of surface-active trehalosemycolates, that is evidenced by the 1.3-1.6-fold increase of the amount of synthesized surface-active substances under such conditions, and by 3-5-fold increase of activity of phosphoenolpyruvate synthetase (key enzyme of gluconeogenesis) and trehalosephosphate synthase.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: *Rhodococcus erythropolis*, trehalosemycolates, trehalosephosphate synthase, synthesis intensification.

T h e a u t h o r s a d d r e s s: *Pirog T.P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Лакін Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
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. *Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.О.* Роль екзогенних попередників в утворенні поверхнево-активних речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* EK-1 на етанолі // Мікробіол. журнал. – 2008. – 70, № 6. – С. 11–18.
4. *Пирог Т.П., Тарасенко Д.А.* Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 48–55.
5. *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. – 40, № 5. – С. 544–550.
6. *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. – P. 248–254.
7. *Cooper R.A., Kornberg H.L.* Methods in Enzymology (Ed. Lowenstein J.M.). New York: Acad. Press, 1969. – 13. – P. 309–314.
8. *Huei-Che Chang, Lane M.D.* The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase // J. Biol. Chem. – 1966. – 241, N 10. – P. 2413–2420.

9. *Mulligan C.N.* Environmental applications for biosurfactants // *Environmental Pollution.* – 2005. – **133.** – P. 183–198.
10. *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.** – P. 6091–6100.

Отримано 12.11.2008