

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук¹, М.А. Шулякова²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

²Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

МЕТАБОЛИЗМ ГЛИЦЕРИНА У ПРОДУЦЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 И *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017

В клетках продуцентов поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, выращенных на глицерине, определены ключевые ферменты метаболизма этого субстрата.

Установлено, что у обоих штаммов катаболизм глицерина до дигидроксиацетонфосфата (интермедиат гликолиза) может осуществляться двумя путями: через глицерин-3-фосфат (активность глицеринкиназы $740\text{--}840$ нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и через дигидроксиацетон. Окисление глицерина до дигидроксиацетона у штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 катализируется пирролохинолинхинон-зависимыми глицериндегидрогеназами и нитрозо-N,N-диметиланилин-зависимыми алкогольдегидрогеназами. Как анаэробические пути у *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 функционируют гликолатный цикл и фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксилазная реакция, у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – только ФЕП-карбоксилазная реакция (1045 ± 52 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).

Полученные данные являются основой для теоретических расчетов оптимального молярного соотношения концентраций энергетически неравноценных субстратов для повышения синтеза ПАВ на их смеси.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, поверхностно-активные вещества, метаболизм глицерина, активность ферментов.

Ранее [6] мы сообщали о возможности использования глицерина (побочного продукта производства биодизеля) в качестве субстрата для синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241.

При росте штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 на глицерине показатели синтеза ПАВ были ниже, чем на этаноле и гексадекане. Тем не менее широкая субстратная специфичность 4-нитрозо-N,N-диметиланилин (НДМА)-зависимых алкогольдегидрогеназ обоих штаммов позволила нам выдвинуть предположение о том, что можно повысить синтез ПАВ, используя для этого смесь энергетически неравноценных ростовых субстратов, в частности, энергетически избыточного гексадекана и энергетически дефицитного глицерина.

Результаты исследований показали, что в таких условиях культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 показатель условной концентрации ПАВ был в 1,5 и 3,6, а *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – в 1,3 и 1,6 раза выше, чем на гексадекане и глицерине соответственно [6]. Отметим, что при культивировании на смешанных субстратах для обеспечения максимальной конверсии углерода в целевой продукт необходимо установление оптимального для его синтеза молярного соотношения концентраций моносубстратов в смеси [7]. А это в свою очередь требует проведения теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза ПАВ и биомассы с последующим определением концентрации дополнительного субстрата, как было установлено нами ранее для микробного полисахарида этаполана [7]. Для осуществления таких теоретических расчетов необходимо знать пути метаболизма соответствующих моносубстратов у продуцентов ПАВ.

Цель данной работы – исследовать особенности метаболизма глицерина у продуцентов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы *A. calcoaceticus* К-4 и *R. erythropolis* ЭК-1, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номерами ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 соответственно.

R. erythropolis ИМВ Ас-5017 выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO₃ – 1,3, NaCl – 1,0, Na₂HPO₄·12H₂O – 0,6, KH₂PO₄ – 0,14, MgSO₄·7H₂O – 0,1, FeSO₄·7H₂O – 0,001, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8–7,0.

© Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, М.А. Шулякова, 2012

A. calcoaceticus ИМВ В-7241 культивировали на среде такого же состава за исключением источника азота: вместо NaNO_3 в среду вносили $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ в концентрации 0,35 г/л. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему) [6].

В качестве источника углерода и энергии использовали глицерин в концентрации 1,0 % (по объему).

Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48–60 ч), выращенная на средах указанного выше состава с 0,5 % (по объему) глицерина. Количество инокулята – 5 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл). Культивирование осуществляли в 750 мл колбах со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °С в течение 24–48 ч.

Для получения бесклеточных экстрактов культуральную жидкость, полученную после выращивания *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в жидкой минеральной среде с глицерином, центрифугировали (4000 г, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (рН 7,0), центрифугируя (4000 г, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (рН 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40–60 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграцию центрифугировали (12000 г, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность НАД⁺-зависимой глицериндегидрогеназы (КФ 1.1.1.6) [17] анализировали спектрофотометрически по восстановлению НАД⁺ при 340 нм с глицерином как донором электронов.

Активность пирролохинолинхинон (ПХХ)-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.2.8) [11] и ПХХ-зависимой глицериндегидрогеназы (КФ 1.1.99.22) [15] определяли по восстановлению дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата при 600 нм с глицерином как донором электронов.

Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) [18] измеряли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-N,N-диметиланилина (НДМА) при 440 нм с глицерином как донором электронов.

Активность дигидроксиацетонкиназы (КФ 2.7.1.29) [13] и глицеринкиназы (КФ 2.7.1.30) [13, 19] определяли по образованию дигидроксиацетонфосфата и глицерин-3-фосфата соответственно, которые анализировали спектрофотометрически по окислению (восстановлению) НАДН (НАД⁺) в сопряженной реакции с глицерин-3-фосфатдегидрогеназой.

Активность флавинадениндуклеотид (ФАД)-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.5.3) [22] определяли по восстановлению 3-(4,5-диметилтриазолил-2-)-2,5-дифенилтетразолий бромида в присутствии феназинметасульфата при 570 нм с глицерин-3-фосфатом как донором электронов.

Активность НАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8) [14] анализировали спектрофотометрически по окислению НАДН при 340 нм с дигидроксиацетонфосфатом как донором электронов.

Активность изоцитратглиазы (КФ 4.1.3.1), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпируват(ФЕП)-синтазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) определяли, как описано ранее [2–4].

Содержание белка в бесклеточных экстрактах рассчитывали по Бредфорд [8]; активность ферментов определяли при 28–30 °С – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано в работе [1]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У микроорганизмов, использующих глицерин в качестве источника углерода и энергии, этот субстрат может ассимилироваться двумя различными путями [9, 10, 16, 17, 20]. Первый путь начинается с АТФ-зависимого фосфорилирования глицерина, катализируемого глицеринкиназой, с образованием глицерин-3-фосфата, который затем окисляется до дигидроксиацетонфосфата при участии глицерин-3-фосфатдегидрогеназы или

глицерин-3-фосфатоксидаза (глицерин-3-фосфатный путь). Оксидазы, как правило, функционируют у факультативных анаэробов [9]. Дигидроксиацетонфосфат является интермедиатом гликолиза и далее метаболизируется по этому пути.

Во втором варианте катаболизма глицерин вначале окисляется до дигидроксиацетона глицериндегидрогеназами (НАД⁺- или ПХХ-зависимыми). Образовавшийся дигидроксиацетон затем фосфорилируется до дигидроксиацетонфосфата при участии дигидроксиацетонкиназы (дигидроксиацетоновый путь). Дигидроксиацетонкиназы делятся на две группы в зависимости от донора фосфорной группы [9]. АТФ-зависимые ферменты характерны в основном для эукариот, хотя встречаются и у бактерий; ФЕП-зависимые киназы преимущественно функционируют у бактерий, например, *Escherichia coli*.

В бесклеточных экстрактах *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 мы не обнаружили НАД⁺-зависимой глицериндегидрогеназной активности, однако выявили активность ПХХ-зависимой глицериндегидрогеназы (табл. 1). Поскольку в предыдущих исследованиях [6] нами была установлена широкая субстратная специфичность НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, на следующем этапе изучали роль этих ферментов в окислении глицерина. Эксперименты показали, что активность НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста, составляла 24–36, а в ранней экспоненциальной фазе достигала 100 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (табл. 1).

Таким образом, окисление глицерина у штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 катализируется двумя ферментами: ПХХ-зависимой глицериндегидрогеназой и НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназой.

Исследование влияния одновалентных катионов на активность ПХХ-зависимого фермента у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 показало, что катионы натрия являются ингибиторами, а калия (при концентрации свыше 25 мМ) – активаторами этой глицериндегидрогеназы (табл. 2).

На следующем этапе у штаммов *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, растущих на глицерине, анализировали активность ферментов глицерин-3-фосфатного пути катаболизма этого субстрата (табл. 3).

Таблица 1

Активность ферментов дигидроксиацетонового пути катаболизма глицерина у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017

Фермент	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
	ИМВ Ас-5017	ИМВ В-7241
НАД ⁺ -зависимая глицериндегидрогеназа (1.1.1.6)	0	0
ПХХ-зависимая глицериндегидрогеназа (1.1.99.22)	93±4	107±5 (149±7)
НДМА-зависимая алкогольдегидрогеназа (1.1.99.36)	24±1,2	32±1,6 (101±5)
ПХХ-зависимая алкогольдегидрогеназа (1.1.2.8)	0	0
Дигидроксиацетонкиназа (2.7.1.29)	288±14	336±16 (750±37)

Примечания. Табл. 1 и 3: активность ферментов определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч). Посевной материал *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 выращен на среде с глицерином без дрожжевого автолизата и микроэлементов. В скобках указана активность ферментов в ранней экспоненциальной фазе роста (24–30 ч).

В бесклеточных экстрактах обоих исследуемых бактерий выявлена достаточно высокая активность глицеринкиназы (около 800 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и НАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназы. Отметим, что в ранней экспоненциальной фазе роста штамма ИМВ В-7241 активность последнего фермента была более чем в два раза выше, чем в середине этой фазы (373 и 159 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). В бесклеточных экстрактах *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 не обнаружена активность ФАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (табл. 3).

**Влияние катионов натрия и калия на активность ПХХ-зависимой
глицериндегидрогеназы *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241**

Катионы	Концентрация, мМ	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка) в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся	
		в ранней экспоненциальной фазе	в середине экспоненциальной фазы
Без катионов		149±7	107±5
Na ⁺	25	149±7	95±5
	50	90±4	60±3
	100	30±1,5	41±2
K ⁺	25	140±7	97±5
	50	209±10	176±9
	100	179±9	137±7

Примечание. Для определения активности фермента клетки отмывали и суспендировали в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 6,3).

Таблица 3

**Активность ферментов глицерин-3-фосфатного пути катаболизма глицерина
у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017**

Фермент	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
	ИМВ Ас-5017	ИМВ В-7241
Глицеринкиназа (2.7.1.30)	800±40	780±39
НАД ⁺ -зависимая глицерин-3-фосфатдегидрогеназа (1.1.1.8)	108±5	159±8 (373±18)
ФАД ⁺ -зависимая глицерин-3-фосфатдегидрогеназа (1.1.5.3)	0	0

Примечание. Активность глицеринкиназы определяли по методике, описанной в работе [13].

В табл. 4 представлены данные об активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных веществ аминокислот (глутаматдегидрогеназа) и гликолипидов (ФЕП-карбоксикиназа, ФЕП-синтаза), а также анаплеротических реакций (изоцитратлиаза и ФЕП-карбоксилаза) при выращивании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на среде с глицерином. Отметим, что в таких условиях культивирования штамма ИМВ В-7241 глиоксилатный шунт не функционирует (не обнаружена активность изоцитратлиазы), а восполнение пула C₄-дикарбоновых кислот осуществляется в ФЕП-карбоксилазной реакции. Достаточно высокая активность ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-синтазы, а также глутаматдегидрогеназы свидетельствуют, что как и при выращивании на этаноле [21], основными компонентами ПАВ, синтезируемых *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с глицерином, являются глико- и аминоклипыды.

Таблица 4

**Активность ферментов биосинтеза ПАВ
при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на глицерине**

Фермент	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
	ИМВ Ас-5017	ИМВ В-7241
НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	Н.о.	597±30
Изоцитратлиаза	44±2	0
ФЕП-карбоксилаза	2727±136	1045±52
ФЕП-синтаза	2428±121	1780±89
ФЕП-карбоксикиназа	909±45	448±22

Примечание. Посевной материал для культивирования штамма ИМВ В-7241 выращен на среде с глицерином без дрожжевого автолизата и микроэлементов. Н.о. – не определяли.

В отличие от *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, у *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, выращенно на глицерине, обнаружена активность изоцитратлиазы (см. табл. 4). Отметим, что активность этого фермента была на порядки ниже, чем ФЕП-карбоксилазная активность (44 и 2727 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). Очевидно, что при росте штамма ИМВ Ас-5017 на

глицерине основной анаплеротической реакцией является реакция, катализируемая ФЕП-карбоксилазой. Как и у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, у *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 выявлена высокая активность ключевых ферментов глюконеогенеза, что может свидетельствовать о биосинтезе из глицерина поверхностно-активных гликолипидов.

Обсуждение. Первой публикацией, обобщающей известные к середине 70-х годов XX ст. данные по особенностям метаболизма глицерина у бактерий, был обзор Lin [16]. В настоящее время интерес к изучению метаболизма глицерина у про- и эукариот обусловлен несколькими причинами [9, 10, 12, 15, 17, 20].

Во-первых, этот спирт в огромных количествах образуется при производстве биодизеля в качестве побочного продукта технологии, и с каждым годом его накапливается все больше и больше [12]. Отметим, что на каждые 100 л биодизеля образуется приблизительно столько же технического глицерина. Только за период с 2004 по 2006 год цена на глицерин снизилась более чем в 10 раз. Перспективным подходом к утилизации избыточного глицерина является его использование в биотехнологической отрасли в качестве субстрата для культивирования микроорганизмов [12, 15].

Во-вторых, глицерин является одним из важнейших протекторных соединений в клетках микроорганизмов, обеспечивающих их защиту от различных неблагоприятных факторов (осмотический, холодовой и др. стрессы) [10, 17, 19, 20].

В-третьих, глицерин является предшественником биосинтеза липидов.

В-четвертых, этот спирт может служить источником углерода и энергии при внутриклеточном развитии патогенных бактерий (*Listeria monocytogenes*, представителей рода *Mycoplasma*) [9].

Отметим, что достаточно активное исследование особенностей метаболизма глицерина у галофильных и психротолерантных бактерий [19–21] является актуальным как с биологической, так и биотехнологической точек зрения. С одной стороны, у галофильных бактерий глицерин служит мощным осмопротектором, а с другой – эти бактерии являются перспективными биологическими агентами для биотехнологических процессов, базирующихся на использовании «сырого», неочищенного глицерина, образуемого при производстве биодизеля. Дело в том, что биодизель получают из растительных масел или животных жиров их трансэтерификацией со спиртами (этанол, метанол) с использованием NaOH (KOH) в качестве катализатора [12]:

NaOH

Триглицериды + Этанол $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Этиловые эфиры (биодизель) + Глицерин.

Таким образом, неочищенный глицерин содержит в достаточно большом количестве Na^+ (K^+), что может служить существенным сдерживающим фактором применения такого субстрата для выращивания негалофильных микроорганизмов.

Психротолерантные бактерии в настоящее время рассматриваются как источник уникальных ферментов, активных при низких температурах и, благодаря этому, перспективных для использования в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [21].

Наши исследования особенностей метаболизма глицерина у продуцентов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 показали, что оба штамма могут метаболизировать этот субстрат до дигидроксиацетонфосфата как через глицерин-3-фосфат, так и дигидроксиацетон. Отметим, что многие микроорганизмы способны реализовывать оба пути превращения глицерина в дигидроксиацетонфосфат. Так, у различных штаммов *Enterococcus faecalis* в аэробных условиях преимущественно функционирует «глицерин-3-фосфатный», а в анаэробных – «дигидроксиацетоновый» путь метаболизма глицерина [9]. У галофильных бактерий [20] и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [17] выявлены ферменты, характерные для обоих путей катаболизма глицерина. В то же время у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* отсутствует глицеринкиназа, но функционирует дигидроксиацетонкиназа и НАД⁺-зависимая глицериндегидрогеназа [17], причем последний фермент очень похож на бактериальные глицериндегидрогеназы.

Отметим, что у большинства микроорганизмов окисление глицерина до дигидроксиацетона осуществляется НАД⁺-зависимыми глицериндегидрогеназами [9, 16, 17, 19, 21]. У исследованных нами обоих штаммов *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 этот фермент не выявлен, однако обнаружена ПХХ-зависимая глицериндегидрогеназа, функционирующая у уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans* [15]. Ранее нами было показано, что окисление этанола и гексадекана у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ

Ac-5017 осуществляется НДМА- и ПХХ-зависимыми алкогольдегидрогеназами [2–4]. Интересно отметить, что у обоих исследуемых штаммов ПХХ-зависимая алкогольдегидрогеназа не принимает участия в окислении глицерина в отличие от НДМА-зависимого фермента. До настоящего времени в доступной нам литературе не удалось обнаружить сведений об окислении глицерина НДМА-зависимыми алкогольдегидрогеназами.

Наши исследования показали, что ПХХ-зависимая глицериндегидрогеназа *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 ингибируется катионами натрия и стимулируется K^+ (табл. 2). Это обстоятельство следует иметь в виду при использовании для культивирования штамма ИМВ В-7241 неочищенного глицерина: желательнее, чтобы в процессе получения биодизеля в качестве катализатора использовали КОН [12].

Глицеринкиназа, катализирующая фосфорилирование глицерина до глицерин-3-фосфата, выявлена у многих бактерий (галофильных, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *E. faecalis*) и грибов (*Candida*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *S. cerevisiae*) [10, 15].

На первых этапах наших исследований обнаруживаемая в бесклеточных экстрактах *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ac-5017 глицеринкиназная активность была невысокой (не превышала $25\text{--}50$ нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и нестабильной. В этих исследованиях для определения активности глицеринкиназы мы использовали достаточно сложную методику, описанную в работе [19]. Отметим, что эта методика была модифицирована авторами для галофильных бактерий *Salinibacter ruber*. Позже другие авторы, исследующие особенности метаболизма галофильных архей *Haloferax volcanii* [10], еще раз модифицировали и упростили методику выявления глицеринкиназы, однако и ее использование не привело нас к желаемому результату. Анализируя полученные нами результаты, мы пришли к выводу, что у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ac-5017 отсутствует глицеринкиназа.

Однако в то же время мы фиксировали достаточно высокую ($200\text{--}400$ нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) активность глицерин-3-фосфатдегидрогеназы – фермента, катализирующего дальнейшее превращение продукта глицеринкиназной реакции (глицерин-3-фосфата) до дигидроксиацетон-фосфата. Такие результаты все-таки предполагали наличие у штаммов ИМВ В-7241 и Ac-5017 глицеринкиназной активности. Дальнейший поиск привел нас к работам конца 70-х – середины 80-х годов XX ст. [13, 14], в которых были описаны более простые методики определения глицеринкиназы. В последующих экспериментах мы использовали методику, изложенную в работе [13] и применяемую для анализа глицеринкиназной активности у *Streptococcus faecalis*. Результаты исследований показали, что у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ac-5017 активность глицеринкиназы достигает $740\text{--}840$ нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка.

Окисление глицерин-3-фосфата до дигидроксиацетонфосфата у микроорганизмов может осуществляться несколькими ферментами: глицерин-3-фосфатоксидазой (*E. faecalis* [9]), ФАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназой (*E. coli* [22]), НАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназой (*Saccharomyces* [14, 23]). Отметим, что у эукариот часто функционирует как растворимая НАД⁺-зависимая, так и митохондриальная ФАД⁺-зависимая дегидрогеназа [23]. Наши исследования показали, что у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ac-5017 образование дигидроксиацетонфосфата катализируется НАД⁺-зависимой глицерин-3-фосфатдегидрогеназой – фермента, характерного преимущественно для эукариот.

Отметим, что в отличие от культивирования на C₂-субстратах [3], при выращивании на глицерине в клетках *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 функционирует одна анаэробная реакция, катализируемая ФЕП-карбоксилазой – одним из ферментов, восполняющих пул C₄-дикарбоновых кислот при росте микроорганизмов на углеводах. В то же время у штамма ИМВ Ac-5017, выращенного на глицерине, обнаружена как изоцитратлиазная, так и ФЕП-карбоксилазная активность. В работе [5] мы обсуждали физиологическую роль ФЕП-карбоксилазы при культивировании штамма ИМВ В-7241 на среде с этанолом и мочевиной как способ обезвреживания углекислого газа, образуемого в уреазной реакции, что в свою очередь сопровождается повышением в клетках бактерий пула C₄-дикарбоновых кислот, усилением глюконогенеза и повышением синтеза поверхностно-активных гликолипидов. Результаты данной работы свидетельствуют, что при использовании глицерина в качестве ростового субстрата для *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 ФЕП-карбоксилазная реакция выполняет две физиологические функции: во-первых, является анаэробной, во-вторых (так же, как и на этаноле) служит своеобразным стоком избыточного CO₂ в клетках бактерий.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что у продуцентов поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, растущих на глицерине, катаболизм этого спирта до дигидроксиацетонфосфата может осуществляться двумя путями (через дигидроксиацетон и глицерин-3-фосфат). Полученные данные являются исходными для проведения теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза ПАВ и биомассы на глицерине с целью интенсификации синтеза ПАВ на смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов.

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук¹, М.О. Шулякова²

¹Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна

²Національний університет харчових технологій,
ул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

**МЕТАБОЛІЗМ ГЛІЦЕРИНУ У ПРОДУЦЕНТІВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241
І *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV Ас-5017**

Резюме

У клітинах продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMV В-7241, вирощених на глицерині, визначені ключові ферменти метаболізму цього субстрату.

Встановлено, що у обох штамів катаболізм глицерину до дигідроксиацетонфосфату (інтермедіат гліколізу) може здійснюватися двома шляхами: через глицерин-3-фосфат (активність гліцеринкінази 740-840 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) і через дигідроксиацетон. Окиснення глицерину до дигідроксиацетону у штамів IMV В-7241 і IMV Ас-5017 каталізуються піролохінолінкінон-залежними гліцериндегідрогеназами і нітросо-N,N-діметиланілін-залежними алкогольдегідрогеназами. Як анаплеротичні шляхи у *R. erythropolis* IMV Ас-5017 функціонують гліоксилатний цикл і фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазна реакція, у *A. calcoaceticus* IMV В-7241 – тільки ФЕП-карбоксилазна реакція (1045±52 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка).

Одержані дані є основою для теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів для підвищення синтезу ПАВ на їх суміші.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017, поверхнево-активні речовини, метаболізм глицерину, активність ферментів

T.P. Pirog^{1,2}, T.A. Shevchuk¹, M.A. Shulyakova²

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

²National University of Food Technologies, Kyiv

**GLYCEROL METABOLISM IN SURFACTANTS PRODUCERS *ACINETOBACTER CALCAACETICUS* IMV B-7241
AND *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV Ас-5017**

S u m m a r y

Key enzymes of glycerol metabolism were detected in the cells of surfactants producers *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017 and *Acinetobacter calcaaceticus* IMV В-7241 grown on glycerol. It has been established that in the both strains glycerol catabolism to dihydroxyacetonephosphate (the intermediate of glycolysis) may be performed in two ways: through glycerol-3-phosphate (glycerol kinase activity 740-840 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of protein) and through dihydroxyacetone. Glycerol oxidation to dihydroxyacetone in the strains IMV В-7241 and Ас-5017 is catalysed by pyrrolo-quinolinquinone-dependent glycerol dehydrogenases and nitroso-N,N-dimethylaniline-dependent alcohol dehydrogenases. Both glyoxylate cycle and phosphoenolpyruvate(PEP)-carboxylase function as anaplerotic paths in *R.erythropolis* IMV Ас-5017, and only PEP-carboxylase reaction (1045±52 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins) functions in *A. calcoaceticus* IMV В-7241. The data obtained serve as the basis for theoretical calculations of optimal molar ratio of concentrations of energetically nonequivalent substrates for intensifying the surfactants synthesis on their mixture.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Acinetobacter calcaaceticus* IMV В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017, surfactants, glycerol metabolism, activity of enzymes.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. – 2008. – 77, № 6. – С. 749–757.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугинець О.С. Особливості окиснення етанолу у продуцента поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Мікробіол. журн. – 2010. – 72, № 6. – С. 3–10.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – 46, № 6. – С. 651–658.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долошенко С.Ю. Роль фосфоенолпируваткарбоксилазы у синтезі поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 9–15.
6. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 1 – С. 20–27.
7. Подгорский В.С., Иутинская Г.А., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – Киев: Наук. думка, 2010. – 327 с.
8. 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.
9. Bizzini A., Zhao C., Budin-Verneuil A., Sauvageot N., Giard J.C., Auffray Y., Hartke A. Glycerol is metabolized in a complex and strain-dependent manner in *Enterococcus faecalis* // J. Bacteriol. – 2010. – 192, N 3. – P. 779–785.
10. Brisson D., Vohl M.C., St-Pierre J., Hudson T.J., Gaudet D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? // BioEssays. – 2001. – 23, N 6. – P. 534–542.
11. 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. – 201, N 1. – P. 41–45.
12. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – 27, N 1. – P. 30–39.
13. Deutscher J., Sauerwald H. Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system // J. Bacteriol. – 1986. – 166, N 3. – P. 829–836.
14. Gancedo C., Gancedo J.M., Sols A. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production // European J. Biochem. – 1968. – 5, N 2. – P. 165–172.
15. Li M.H., Wu J., Liu X., Lin J.P., Wei D.Z., Chen H. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans* // Bioresour. Technol. – 2010. – 101, N 21. – P. 8294–8299.
16. Lin E.C.C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. – 1976. – 30. – P. 535–578.
17. Matsuzawa T., Ohashi T., Hosomi A., Tanaka N., Tohda H., Takegawa K. The *gld1*⁺ gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 87, N 2. – P. 715–727.
18. 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. – 146, N 4. – P. 775–785.
19. Sher J., Elevi R., Mana L., Oren A. Glycerol metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber* // FEMS Microbiol. – 2004. – 232, N 2. – P. 211–215.
20. Sherwood K.E., Cano D.J., Maupin-Furlow J.A. Glycerol-mediated repression of glucose metabolism and glycerol kinases as the sole route of glycerol catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* // J. Bacteriol. – 2009. – 191, N 13. – P. 4307–4315.
21. Stibor M., Potocky M., Pickova A., Karasova P., Russell N.J., Kralova B. Characterization of cold-active dehydrogenases for secondary alcohols and glycerol in psychrotolerant bacteria isolated from Antarctic soil // Enzyme Microbial Technol. 2010. – 32, N 5. – P. 532–538.
22. Walz A.C., Demel R.A., de Kruijff B., Mutzel R. Aerobic *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* binds to the cytoplasmic membrane through an amphipathic α -helix // Biochem. J. – 2002. – 365, № 2. – P. 471–479.
23. Wang H.T., Rahaim P., Robbins P., Yocum R.R. Cloning, sequence and disruption of the *Saccharomyces diastaticus* DARI gene encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase // J. Bacteriol. – 1994. – 176, N 22. – P. 7091–7095.

Отримано 19.05.2011