

THE FEATURES OF GLYCEROL METABOLISM FOR A PRODUCER OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

T. Schevchuk

D.K. Zabolotniy Institute of Mikrobiology and Virusology NAN Ukraine

O. Mashchenko, T. Pirog

National University of Food Technologies

Key words:
Nocardia vaccinii IMV B-7405
Surface-active substances
Glycerol metabolism
Activity of enzymes

Article history:
Received 30.03.2013
Received in revised form 19.04.2013
Accepted 23.05.2013

Corresponding author:

E-mail:
tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

It was shown that *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, which is a surface-active substances (SAS) producer, converts glycerol to dihydroxyacetonephosphate (DHAP) via two metabolic pathways: through the glycerol-3-phosphate and through dihydroxyacetone.

In strain IMV B-7405, the oxidation of glycerol into dihydroxyacetone is catalyzed by pyrroloquinoline quinone-dependent (PQQ-dependent) glyceroldehydrogenase and N, N-dimethylnitrosamine-dependent (NDMA-dependent) alcohol dehydrogenase (256 and 550 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein, respectively).

It should be mentioned that under the growth of *N. vaccinii* IMV B-7405 in medium with glycerol, the main anaplerotic reaction for refilling the pool of C4-dicarboxylic acids is phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase reaction (656 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein).

The revealed high activity of glutamate dehydrogenase and key enzymes of gluconeogenesis indicates the ability of *N. vaccinii* IMV B-7405 to synthesize surface-active amino- and glycolipids from glycerol.

The obtained data could be the basis for theoretical calculations of the optimal molar ratio of energy unequivalent substrates concentrations in order to increase the synthesis of SAS of *N. vaccinii* IMV B-7405 on their mixture.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІЦЕРИНУ У ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405

Т.А. Шевчук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

О.Ю. Мащенко, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

Встановлено, що в клітинах продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 метаболізм гліцерину до дигідроксиацетонфосфату здійснюється двома шляхами: через гліцерин-3-фосфат і через дигідроксиацетон.

Окиснення гліцерину до дигідроксиацетону у штаму ІМВ В-7405 каталізується піролохінолі-хінон (ПХХ)-залежною гліцериндегідрогеназою і нітрозоз-*N,N*-диметиланілін (НДМА)- залежною алкогольдегідрогеназою (256 і 550 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, відповідно).

Основною анаплеротичною реакцією у клітинах *N. vaccinii* ІМВ В-7405, в якій відбувається поповнення пулу C_4 -дикарбонових кислот, є фосфоенолпіруват (ФЕП)-карбоксилазна реакція ($656 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка).

Виявлена висока активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, а також ключових ферментів глюконеогенезу (ФЕП-синтетази та ФЕП-карбоксикинази), свідчить про здатність штаму ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів.

Отримані дані є основою для теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрації енергетично нерівноцінних субстратів для підвищення синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на їх суміші.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, поверхнево-активні речовини, метаболізм гліцерину, активність ферментів.

Надшвидке збільшення обсягів виробництва біодизелю створило надлишок технічного гліцерину (побічного продукту трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів), що в свою чергу призвело до зниження ціни на цей продукт в 10 разів тільки за останні роки та необхідності його утилізації. Одним із альтернативних шляхів вирішення цієї проблеми є використання гліцерину в технологіях мікробного синтезу практично цінних продуктів, у тому числі й для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) [1].

Поверхнево-активні речовини є відносно новим продуктом біотехнології, оскільки почали розроблятися у 80 роках ХХ ст. Ці сполуки мають суттєві переваги перед синтетичними аналогами, зокрема біодеградабельність, що виключає забруднення навколишнього середовища, стійкість до екстремальних температур, рН, а також різноманітна біологічна активність та не токсичність [2]. За хімічною природою ПАР мікробного походження належать до таких груп: гліколіпіди, ліпопротеїни, ліпопептиди, фосфоліпіди, нейтральні ліпіди, жирні кислоти та ін.

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій *Nocardia vaccinii* К-8, який депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7405. Встановлено здатність штаму ІМВ В-7405 синтезувати позаклітинні метаболіти з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями під час росту на гідрофобних та гідрофільних субстратах [3].

Раніше було показано принципову можливість інтенсифікації синтезу ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 за використання суміші гліцерину з іншими субстратами як джерела вуглецю і енергії. Проте для забезпечення максимальної конверсії вуглецю в цільовий продукт необхідне встановлення оптимального для його синтезу молярного співвідношення концентрацій моносубстратів в суміші, що в свою чергу вимагає проведення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси з наступним визначенням концентрації додаткового субстрату та встановлення шляхів метаболізму відповідних моносубстратів.

Тому метою даної роботи було дослідження особливостей метаболізму гліцерину у *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Культивування бактерій проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $\text{NaNO}_3 - 0,5$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$, рН 6,8–7,0.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин 1,5 % (об'ємна частка). У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,001 \text{ г/л}$.

Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на глюкозокартопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % гліцерину, 0,5 % дріжджового автолізату, 0,001 г/л $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С.

Безклітинні екстракти, одержували як описано в роботі [4].

Активність НАД⁺-залежної гліцериндегідрогенази (КФ 1.1.1.6), піролохінолінхінон (ПХХ)-залежної алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.2.8), ПХХ-залежної гліцериндегідрогенази (КФ 1.1.99.22), нікотинопротейн-залежної (НАД(Ф)Н) алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.99.36), дигідроксиацетонкінази (КФ 2.7.1.29), гліцеринкінази (КФ 2.7.1.30) флавінаденіндинуклеотид(ФАД)-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.5.3), НАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.8) визначали як описано в роботі [4].

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1), НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2), (ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилази (КФ 4.1.1.31) визначали, як описано раніше [5 – 7].

Вміст білку в безклітинних екстрактах розраховували за Бредфорд [8]; активність ферментів визначали при 28 – 30 °С — температурі, що оптимальній для росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Всі досліди проводили в 3 повторностях. Різницю середніх показників вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$.

У мікроорганізмів, що використовують гліцерин як джерело енергії, цей субстрат асимілюється двома шляхами [9]. Перший шлях починається з АТФ-залежного фосфорилування гліцерину, що каталізується гліцеринкіназою, з утворенням гліцерин-3-фосфату, який в подальшому окиснюється до дигідроксиацетонфосфату за участю гліцерин-3-фосфатдегідрогенази або гліцерин-3-фосфатоксидази (гліцерин-3-фосфатний шлях). Другий шлях катаболізму починається окисненням гліцерину до дигідроксиацетону гліцериндегідрогеназами (нікотинамдаденіндинуклеотид- (НАД⁺) або піролохінолінхінон (ПХХ)-залежними). Дигідроксиацетон, що утворився, далі фосфорилується до дигідроксиацетонфосфату за участю дигідроксиацетонкінази (дигідроксиацетонівий шлях). Дигідроксиацетонфосфат є інтермедіатом гліколізу і далі метаболізується за цим шляхом.

Хоча одного шляху дисиміляції гліцерину достатньо для забезпечення потреб клітин, у деяких мікроорганізмів функціонують обидва шляхи [10].

Так, у різних мікроорганізмів в аеробних умовах переважно функціонує «гліцерин-3-фосфатний», а в анаеробних — «дигідроксиацетонівий» шлях метаболізму гліцерину [11]. Проте, не зважаючи на це, у *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 (строгі аероби) окиснення гліцерину до дигідроксиацетонфосфату здійснюється двома відомими шляхами [4].

Зазначимо, що у більшості мікроорганізмів окиснення гліцерину до дигідроксиацетону здійснюється НАД⁺-залежними гліцериндегідрогеназами [11]. При визначенні активності ферментів дигідроксиацетонівого шляху цього ферменту у дослідженого штаму не виявлено, проте виявлена гліцериндегідрогеназа. Раніше [4] було показано, що окиснення етанолу та гексадекану у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 здійснюється НДМА- і ПХХ-залежними алкогольдегідрогеназами. При визначенні активності цих ферментів у клітинах *N. vaccinii* ІМВ В-7405, вирощених на гліцерині, було зафіксовано досить високу активність тільки НДМА-залежної алкогольдегідрогенази (аналогічні результати було отримано для *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 [4]) (таблиця). На сьогоднішній день у доступній літературі нам не вдалося знайти даних про окиснення гліцерину у мікроорганізмів НДМА-залежними алкогольдегідрогеназами.

У процесі визначення активності ферментів гліцерин-3-фосфатного шляху у *N. vaccinii* ІМВ В-7405 встановлено, що катаболізм гліцерину до гліцерин-3-фосфату здійснюється за допомогою гліцеринкінази.

У безклітинних екстрактах *N. vaccinii* ІМВ В-7405 не виявлено активності ФАД⁺-залежної гліцерин-3-фосфатдегідрогенази. Встановлено, що утворення дигідроксиацетонфосфату каталізується НАД⁺-залежною гліцерин-3-фосфатдегідрогеназою — ферменту, характерного переважно для еукаріот (таблиця).

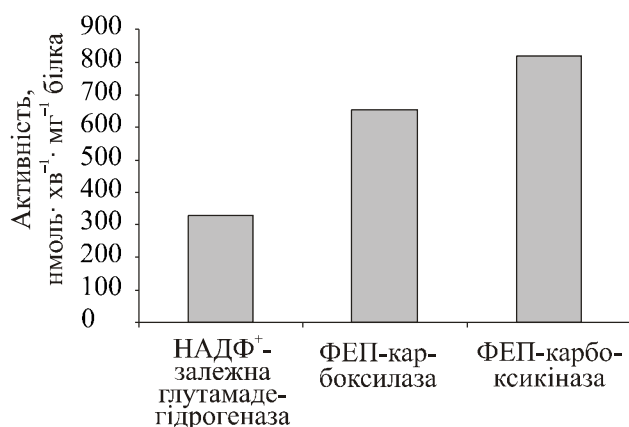
Отже, у катаболізмі гліцерину *N. vaccinii* ІМВ В-7405 беруть участь такі ферменти: ПХХ-залежна гліцериндегідрогеназа, НДМА-залежна алкогольдегідрогеназа та дигідроксиацетонкіназа (дигідроксиацетонівий шлях); гліцеринкіназа та НАД⁺-залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (гліцерин-3-фосфатний шлях), про що свідчать досить високі активності даних ферментів (таблиця).

Таблиця. Активність ферментів шляхів катаболізму гліцерину у N. vaccinii IMB B-7405

Шлях катаболізму гліцерину	Фермент	Активність (нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка)
		IMB B-7405
Дигідрокси-ацетоновий	ПХХ-залежна гліцериндегідрогеназа	256±13
	НДМА-залежна алкогольдегідрогеназа	550±28
	Дигідроксиацетонкіназа	732±37
	НАД ⁺ -залежна гліцериндегідрогеназа	0
	ПХХ-залежна алкогольдідрогеназа	0
Гліцерин-3-фосфатний	Гліцеринкіназа	244±12
	НАД ⁺ -залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа	488±24
	ФАД ⁺ -залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа	0

Примітка. Активність ферментів визначали в безклітинних екстрактах, отриманих з клітин, що перебували в середині експоненційної фази росту.

На наступному етапі аналізували активність ферментів біосинтезу ПАР у штаму IMB B-7405. Раніше було показано, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 за умов росту на гліцерині, представлені комплексом нейтральних, гліко- та аміноліпідів [3].



Активність ферментів біосинтезу ПАР та анаплеротичних реакцій під час росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на гліцерині

Встановлено, що у процесі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на гліцерині гліоксилатний цикл не функціонує (не виявлено активності ізоцитратліази), а поповнення пулу С₄-дикарбонових кислот відбувається у ФЕП-карбоксілазній реакції (рисунк). Аналогічні результати було отримано і для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [4]. Зазначимо, що на відміну від *N. vaccinii* IMB B-7405 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241, у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 хоч і було виявлено невисоку активність ізоцитратліази, вона була на порядки нижчою, ніж ФЕП-карбоксілазна активність [4].

Виявлена у безклітинних екстрактах досить висока активність ключових ферментів глюконеогенезу може свідчити про біосинтез із гліцерину гліколіпідів (активність ФЕП-синтетази і ФЕП-карбоккінази — 23667 та 820 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка, відповідно), а активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (329 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) — про утворення ще й поверхнево-активних аміноліпідів (рисунк).

Висновки

Катаболізм гліцерину до дигідроксиацетону у продуцента поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснюється двома шляхами: через дигідроксиацетон і гліцерин-3-фосфат.

Встановлено, що окиснення гліцерину у штаму ІМВ В-7405 каталізується ПХХ-залежною гліцериндегідрогеназою і НДМА- залежною алкогольдегідрогеназою (256 і 550 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка, відповідно).

За умов росту на гліцерині *N. vaccinii* ІМВ В-7405, основною анаплеротичною є ФЕП-карбоксілазна реакція, в якій відбувається поповнення пулу С₄-дикарбонових кислот.

Досить висока активність ферментів глюконеогенезу і НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази свідчить про синтез штамом ІМВ В-7405 поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів.

Література

1. da Silva G *Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology* / G. da Silva, M. Mack, J. Contiero // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — Vol. 27, № 1. — P. 30 – 39.
2. Banat I. *Microbial biosurfactants production, applications and future potential* / I. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. Martinotti, L. Fracchia, T. Smyth, R. Marchant // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 87, № 2. — P. 427 – 444.
3. Пирог Т.П. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при конверсии отходов производства биодизеля / Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко, Д.И. Хомяк, А.Д. Конон // *Микробиол. журнал.* — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20 – 27.
4. Пирог Т.П. Метаболизм глицерина у продуцентов поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, М.А. Шулякова // *Микробиол. журнал.* — 2012. — Т. 74, № 4 — С. 29 – 36.
5. Пирог Т.П. Особенности С₂-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.
6. Пирог Т.П. Особливості окиснення етанолу у продуцента поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.С. Дугінець // *Мікробіол. журнал.* — 2010. — Т. 72, № 6. — С. 3 – 10.
7. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Ю.А. Клименко // *Прикл. биохимия и микробиология.* — 2010. — Т. 46, № 6. — С. 651 – 658.
8. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72, № 3. — P. 248 – 254.
9. Bizzini A. Glycerol is metabolized in a complex and strain-dependent manner in *Enterococcus faecalis* / A. Bizzini, C. Zhao, A. Budin-Verneuil, N. Sauvageot, J.C. Giard, Y. Auffray, A. Hartke // *J. Bacteriol.* — 2010. — V. 192, № 3. — P. 779 – 785.
10. Matsuzawa T. The *gld1+* gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe* / T. Matsuzawa, T. Ohashi, A. Hosomi, N. Tanaka, H. Tohda // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 87, № 2. — P. 715 – 722.
11. Freitas F. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol / F. Freitas, V. D. Alves, J. Pais, M. Carvalheira, N. Costa, R. Oliveira, M. A. M. Reis // *Process Biochemistry.* — 2010. — Vol. 45. — P. 297 – 305.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИЦЕРИНА У ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* ИМВ В-7405

Т.П. Шевчук

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

О.Ю. Машенко, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

Установлено, что в клетках продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 метаболизм глицерина до дигидроксиацетонфосфата осуществляется двумя путями, через глицерин-3-фосфат и через дигидроксиацетон.

Окисления глицерина до дигидроксиацетона у штамма ИМВ В-7405 катализируется пирролохинолинхинон (ПХХ) — зависимой глицериндегидрогеназой и нитрозо-*N,N*-диметиланилин (НДМА) — зависимой алкогольдегидрогеназой (256 и 550 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, соответственно).

Основной анаэробической реакцией в клетках *N. vaccinii* ИМВ В-7405, в которой осуществляется восполнение пула C₄-дикарбоновых кислот, является фосфоенолпируват (ФЕП)-карбоксилазная реакция (656 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).

Обнаруженная высокая активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы, а также ключевых ферментов глюконеогенеза (ФЕП-синтазы и ФЭП-карбоксикиназы) свидетельствует о способности штамма ИМВ В-7405 к синтезу поверхностно-активных amino- и гликолипидов.

Полученные данные являются основой для теоретических расчетов оптимального молярного соотношения концентраций энергетически неравноценных субстратов для повышения синтеза ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на их смеси.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, поверхностно-активные вещества, метаболизм глицерина, активность ферментов.