

## PECULIARITIES OF CENTRAL METABOLISM IN *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 AS A PRODUCER OF BIOSURFACTANTS

T. Pirog, T. Shevchuk, K. Beregova, N. Kudrya

National University of Food Technologies

---

**Key words:**

*Nocardia vaccinii* IMV B-7405

Central metabolism

Anaplerotic reactions

Activity of enzymes

Carbohydrate and non-carbohydrate substrates

---

**Article history:**

Received 03.08.2014

Received in revised form 17.08.2014

Accepted 26.08.2014

---

**Corresponding author:**

T. Pirog

**E-mail:**

tapirog@nuft.edu.ua

---

**ABSTRACT**

The activity of the enzymes of tricarboxylic acid cycle (TCA) and anaplerotic and some biosynthetic pathways in producing surfactants *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 grown on a carbohydrate (glucose) and non-carbohydrate (glycerol) substrates was studied. In the cells of the strain IMV B-7405 grown on both glucose and glycerol NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase activity ( $6 \pm 128$  and  $328 \pm 16$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein, respectively), and the activity of NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-dependent malate dehydrogenase ( $300$ — $1600$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein) was detected. The absence in *N. vaccinii* of IMV B-7405 2-oxoglutarate activity may indicate the operation in this strain of alternative ways involving 2-oxoglutarate in the TCA cycle. Filling up the pool of the C<sub>4</sub>-dicarboxylic acids in *N. vaccinii* IMV B-7405 occurs in the phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase reaction ( $650$ — $1200$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein). High activity of both key enzymes of gluconeogenesis (PEP carboxykinase and PEP synthase,  $800$ — $2400$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein) and NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase ( $300$ — $1900$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein) confirmed the ability of IMV B-7405 strain to synthesis of surface active glyco- and aminolipids respectively. The obtained data are the basis for the theoretical calculations of optimal molar ratio of unequal energy substrates concentrations to enhance the surfactants synthesis under *N. vaccinii* IMV B-7405 cultivation on their mixture.

---

## ОСОБЛИВОСТІ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 — ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Х.А. Берегова, Н.В. Кудря

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено активність ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК), анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 за умов росту на

вуглеводних (глюкоза) і неуглеводних (гліцерин) субстратах. У клітинах штаму ІМВ В-7405, вирощеного як на глюкозі, так і на гліцерині, виявлено НАДФ<sup>+</sup>-залежну ізоцитратдегідрогеназна активність ( $128 \pm 6$  і  $328 \pm 16$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка відповідно), а також активність НАД<sup>+</sup>- і НАДФ<sup>+</sup>-залежних малатдегідрогеназ ( $300$ — $1600$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка). Відсутність у *N. vaccinii* ІМВ В-7405 активності 2-оксоглутаратдегідрогенази може свідчити про функціонування у цього штаму альтернативних шляхів залучення 2-оксоглутарату до ЦТК. Поповнення пулу С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот у штаму ІМВ В-7405 відбувається у фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазній реакції ( $650$ — $1200$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка). Висока активність обох ключових ферментів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикинази і ФЕП-синтетази,  $800$ — $2400$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка) і НАДФ<sup>+</sup>-залежної глутаматдегідрогенази ( $300$ — $1900$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка) підтвердила здатність штаму ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів. Одержані дані є основою для проведення теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних субстратів для підвищення синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на їх суміші.

**Ключові слова:** *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, центральний метаболізм, анаплеротичні реакції, активність ферментів, вуглеводні і неуглеводні субстрати.

На даний час у світі спостерігається підвищений інтерес до застосування мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) у різних галузях промисловості, що зумовлено їхньою екологічною безпечністю та високою ефективністю [1—4]. Проте, незважаючи на очевидні переваги мікробних ПАР, перед синтетичними аналогами існують проблеми, пов'язані з впровадженням їх промислового виробництва. У зв'язку з цим дослідження останнього десятиліття фокусуються на визначенні підходів до здешевлення технологій мікробних ПАР [5, 6]. Згідно із [5], факторами, які лімітують використання ПАР мікробного походження у промислових масштабах, є висока вартість субстратів для їхнього синтезу, невисокий вихід продукту, а також утворення суміші сполук, а не однієї чистої поверхнево-активної речовини. Дані фактори, а також інші тонкощі біотехнологічного виробництва ПАР (наприклад, необхідність додавання піногасника, вартісне обладнання тощо) зумовлюють високу вартість кінцевого продукту.

Одним із шляхів інтенсифікації технологій мікробного синтезу практично важливих метаболітів є використання для їх одержання змішаних енергетично нерівноцінних ростових субстратів [7].

Наші попередні дослідження показали можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол, глюкоза) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 [8]. Встановлено, що максимальні значення умовної концентрації ПАР (4,8) спостерігалися за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші глюкози з гліцерином.

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 [7] і поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 [9, 10]. 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.

Мета: дослідження активності ключових ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК), анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за умов росту на вуглеводних (глюкоза) і неуглеводних (гліцерин) субстратах.

Основний об'єкт досліджень ізольований нами із забрудненого нафтою зразка ґрунту та ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8. Штам К-8 депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером ІМВ В-7405.

Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю й енергії використовували гліцерин і глюкозу в концентрації 0,5 % (об'ємна та масова частка відповідно).

Як посівний матеріал використовували культуру *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з експоненційної фази росту, вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з відповідними джерелами вуглецю у концентрації 0,5 %. Концентрація посівного матеріалу ( $10^4$ — $10^5$  клітин/мл) становила 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) упродовж 48 год при 30°C.

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на рідкому мінеральному середовищі, центрифугували (5000 g, 10 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (5000 g, 10 хв, 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) та руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 60 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Отриманий дезінтеграт центрифугували (10000 g, 15 хв), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) встановлювали за швидкістю утворення фенілгідразону гліоксилату при 324 нм, ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41), малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) визначали за відновленням  $\text{НАД}^+$ , а ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42), малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.82) — за відновленням  $\text{НАДФ}^+$  при 340 за наявності ізоцитрату чи малату відповідно, 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2) — за відновленням  $\text{НАД}^+$  при 340 нм за наявності 2-оксоглутарату та коензиму А, як описано раніше [11].

Активність піруваткарбоксілази (КФ 6.4.1.1) визначали за швидкістю утворення оксалоацетату й окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою, фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2) — за швидкістю утворення пірувату, яку визначали за окисненням НАДН при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) — за утворенням ФЕП та пірувату у процесі окиснення НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) — за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм, ФЕП-карбоксілази (КФ 4.1.1.31) – за окисненням НАДН при 340 нм, як описано в [11].

Активність глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2), малатдегідрогенази (декарбоксилувальної) (КФ 1.1.1.38 і КФ 1.1.1.40) встановлювали за відновленням НАД<sup>+</sup> і НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм за наявності 2-оксоглутарату та малату відповідно, згідно з методиками, описаними в[11].

Активність ферментів у безклітинних екстрактах визначали при температурі 28—30 °С, що є оптимальною для росту штаму ІМВ В-7405, та виражали у нмоль/хв мг білка. Вміст білка в безклітинних екстрактах визначали за Bradford.

У табл. 1 наведено активність деяких ферментів циклу трикарбонових кислот у клітинах штаму ІМВ В-7405, вирощених на гліцерині і глюкозі.

*Таблиця 1. Активність деяких ферментів циклу трикарбонових кислот у N. vaccinii ІМВ В-7405*

Фермент	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
НАД <sup>+</sup> -залежна ізоцитратдегідрогеназа	0	0
НАДФ <sup>+</sup> -залежна ізоцитратдегідрогеназа	328±16	128±6
2-Оксоглутаратдегідрогеназа	0	0
НАД <sup>+</sup> -залежна малатдегідрогеназа	239±11	321±16
НАДФ <sup>+</sup> -залежна малатдегідрогеназа	567±28	1600±80

Виявилось неочікуваним, що під час росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 як на гліцерині, так і на глюкозі у клітинах бактерій була відсутня активність ключового ферменту ЦТК — 2-оксоглутаратдегідрогенази, хоча у той же час виявлена НАД<sup>+</sup>- і НАДФ<sup>+</sup>-залежна малатдегідрогеназна активність — ферментів циклу трикарбонових кислот (табл. 1). Отже, як утворюється сукцинат у штаму ІМВ В-7405, невідомо. Слід зазначити, що у процесі культивування мікроорганізмів на неуглеводних субстратах утворення сукцинату може відбуватися в гліюксилатному циклі, ключовим ферментом якого є ізоцитратліаза [7]. Проте подальші дослідження показали, що за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на обох досліджуваних субстратах у клітинах бактерій цей фермент не функціонує, а анаплеротичною реакцією, що поповнює вміст пулу С<sub>4</sub> дикарбонових кислот, є ФЕП-карбоксілазна реакція (табл. 2).

**Таблиця 2 Активність ферментів анаплеротичних реакцій у *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Фермент	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
Ізоцитратліаза	0	0
ФЕП-карбоксилаза	656±33	1200±60
Піруваткарбоксилаза	10±0,5	14±0,7
НАД <sup>+</sup> -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	0	0
НАДФ <sup>+</sup> -залежна малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)	15±0,7	12±0,6

У той же час останніми роками у літературі стали з'являтися дані про альтернативні шляхи залучення 2-оксоглутарату до циклу трикарбонових кислот (перетворення 2-оксоглутаратдегідрогенази на сукцинат) у мікроорганізмів [12—14]. Так, у представників родів *Mycobacterium* і *Rhizobium* 2-оксоглутарат, утворюваний в ізоцитратдегідрогеназній реакції ЦТК, за участю 2-оксоглутаратдекарбоксилази перетворюється на сукцинат-напівальдегід, який у наступній НАД(Ф)<sup>+</sup>-залежній дегідрогеназній реакції відновлюється до сукцинату [12, 13]. В інших мікроорганізмів (наприклад, бактерій *Hydrogenobacter thermophiles*) сукцинат утворюється з 2-оксоглутарату у 2-оксоглутарат:фередоксин-оксидоредуктазній реакції [14]. Варто зауважити, що в Кіотській енциклопедії геномів і геномів [www.genome.jp/kegg/ KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database] наведена інформація про наявність цього ферменту у деяких представників роду *Nocardia*. З'ясуванню питання, які саме альтернативні шляхи залучення 2-оксоглутарату до ЦТК функціонують у штаму ІМВ В-7405, будуть присвячені наші подальші дослідження.

У табл. 3 наведено дані про активність ферментів біосинтезу ПАР у клітинах штаму ІМВ В-7405, вирощених на гліцерині та глюкозі. Ензиматичні дослідження підтвердили здатність *N. vaccinii* ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних гліко- та аміноліпідів, що засвідчила висока активність ферментів глюконеогенезу (ФЕП-карбоксикіназа та ФЕП-синтетаза) і НАДФ<sup>+</sup>-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту бактерій як на глюкозі, так і на гліцерині.

**Таблиця 3 Активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин у *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Фермент	Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на	
	гліцерині	глюкозі
ФЕП-карбоксикіназа	820±41	1015±50

ФЕП-синтезаза	2366±118	2406±120
НАДФ <sup>+</sup> -залежна глутаматдегідрогеназа	329±16	1855±92
НАД <sup>+</sup> -залежна глутаматдегідрогеназа	0	0

### **Висновки**

Отже, у результаті проведених досліджень визначено активність ключових ферментів циклу трикарбонових кислот, анаплеротичних і біосинтетичних шляхів у *N. vaccinii* ІМВ В-7405, вирощених на вуглеводних і неуглеводних субстратах. Одержані дані є вихідними для здійснення теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення концентрації моно-субстратів у суміші з метою інтенсифікації синтезу ПАР.

### **Література**

1. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // Int. J. Mol. Sci. — 2011. — Vol 12, № 1. — P. 633—654.
2. Kalyani R. Bishwambhar M., Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // Int. Res. J. Pharm. — 2011. — Vol. 2. № 8. — P. 11—15.
3. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97, № 6. — P. 2327—2339.
4. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97, № 3. — P. 1005—1016. doi:10.1007/s00253-012-4641-8.
5. Sylđatk C., Hausmann R. Microbial biosurfactants // Eur. J. Lipid Sci. Technol. — 2010. — Vol. 112, № 6. — P. 615—616.
6. Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // AMB Express. — 2011. — 1:5. doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
7. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
8. Кудря Н., Пирог Т. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші ростових субстратів // Ukrainian food journal. — 2013. — Vol. 2, Iss. 2. — С. 203—209.
9. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец І.В. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на суміші гексадекана і глицерину // Мікробіологія. — 2012. — Т. 81, № 5. — С. 611—618.
10. Пирог Т.П., Шулякова М.О., Шевчук Т.А. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах // Biotechnologia Acta. — 2013. — Vol. 6, № 6. — P. 28—44.

11. Pirog T.P., Korzh Yu.V., Shevchuk T.A., Tarasenko D.O. Peculiarities of C<sub>2</sub> metabolism and intensification of the synthesis of surface active substances in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 grown in ethanol // Microbiology. — 2008. — Vol. 77, № 6. — P. 665—673.

12. Tian J., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102, № 30. — P. 10670—10675.

13. Aoshima M. Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 75, № 2. — P. 249—255.

14. Yamamoto M., Ikeda T., Arai H., Ishii M., Igarashi Y. Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophiles* // Extremophiles. — 2010. — Vol. 14, № 1. — P. 79—85. doi: 10.1007/s00792-009-0289-4.

## ОСОБЕННОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 — ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, К.А. Береговая, Н.В. Кудря  
Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), анаплеротических и некоторых биосинтетических путей у продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 при культивировании на углеводных (глюкоза) и неуглеводных (глицерин) субстратах. В клетках штамма IMB B-7405, выращенного как на глюкозе, так и на глицерине, обнаружена НАДФ<sup>+</sup>-зависимая изоцитратдегидрогеназная активность ( $128 \pm 6$  и  $328 \pm 16$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка соответственно), а также активность НАД<sup>+</sup>- и НАДФ<sup>+</sup>-зависимых малатдегидрогеназ ( $300$ — $1600$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка). Отсутствие у *N. vaccinii* IMB B-7405 активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы может свидетельствовать о функционировании в этом штамме альтернативных путей вовлечения 2-оксоглутарата в ЦТК. Восполнение пула С<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот у штамма IMB B-7405 происходит в фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксилазной реакции ( $650$ — $1200$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка). Высокая активность обоих ключевых ферментов глюконеогенеза (ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-синтазы,  $800$ — $2400$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка) и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы ( $300$ — $1900$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка) подтвердила способность штамма IMB B-7405 к синтезу поверхностно-активных глико- и аминлипидов соответственно. Полученные данные являются основой для проведения теоретических расчетов оптимального молярного соотношения концентраций энергетически неравноценных субстратов для повышения синтеза ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 на их смеси.

**Ключевые слова:** *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, центральный метаболизм, анаплеротические реакции, активность ферментов, углеводные и неуглеводные субстраты.