

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, С.И. Антонюк<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Кравченко<sup>1</sup>, Г.А. Иутинская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий,  
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

## ВЛИЯНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Исследовано влияние одновалентных катионов на активность ключевых ферментов  $S_2$ -метаболизма у продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, выращенного на этаноле.

Установлено, что катионы калия являются ингибиторами пирролохинолинхинон-зависимых алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ, ферментов биосинтеза поверхностно-активных аминолипидов (НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы) и гликолипидов (фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксикиназы), а катионы аммония – активаторами этих ферментов и ФЕП-карбоксилазы. Снижение в среде культивирования концентрации катионов калия до 1 мМ и повышение содержания аминного азота до 10 мМ в результате замены нитрата калия на эквивалентную по азоту концентрацию мочевины сопровождалось увеличением активности ферментов метаболизма этанола и биосинтеза ПАВ, а также повышением в 2 раза условной концентрации поверхностно-активных веществ.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, метаболизм этанола, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, ключевые ферменты.

Ранее было показано, что *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, выделенный нами из загрязненных нефтью образцов почвы, образует низкомолекулярные поверхностно-активные вещества (ПАВ) при росте на гидрофобных и гидрофильных субстратах [10]. Отметим, что штамм IMB B-7241 является интересным и необычным как с биотехнологической, так и биологической точек зрения по следующим причинам.

Во-первых, большинство представителей рода *Acinetobacter* синтезируют высокомолекулярные ПАВ, обладающие эмульгирующими, но не поверхностно-активными свойствами [5, 13]. Наиболее изученными на сегодняшний день являются эмульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, новое название – *A. venetianus* RAG-1 [5], *A. calcoaceticus* BD4), алазан (продуцент *A. radioresistens* K53 и KA53), дисперсан (продуцент *A. calcoaceticus* A2). По химической природе указанные биосурфактанты представляют собой комплексы внеклеточных полисахаридов и белков. Лишь недавно [18] в литературе появилось одно из первых сообщений о способности представителей рода *Acinetobacter* синтезировать низкомолекулярные ПАВ, однако только при культивировании на гидрофобных субстратах.

Во-вторых, изолированный нами штамм IMB B-7241 образует ПАВ при выращивании на этаноле. Отметим, что на сегодняшний день в литературе практически отсутствуют сведения о способности микроорганизмов синтезировать низкомолекулярные поверхностно-активные вещества на этом субстрате. Ранее нами была показана возможность образования ПАВ штаммом *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 как на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины), так и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах [3, 10, 12].

В-третьих, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезирует необычные по химическому составу ПАВ, представляющие собой комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов [11], причем гликолипиды представлены трегалозомиколатами – метаболитами, характерными для бактерий рода *Rhodococcus*, но не *Acinetobacter* [13]. Способность *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезировать трегалозомиколаты подтверждена также и энзимологическими исследованиями [1].

© Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, С.И. Антонюк, Е.Ю. Кравченко, Г.А. Иутинская, 2013

В-четвертых, исследование особенностей  $C_2$ -метаболизма *A. calcoaceticus* IMB В-7241 показало наличие у штамма ферментов, не характерных для представителей рода *Acinetobacter* [1]. К таким ферментам относятся прежде всего 4-нитрозо-N,N-диметиланилин(НДМА)-зависимые алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназы, пирролохинолинхинон(ПХХ)-зависимая ацетальдегиддегидрогеназа, АТФ-зависимая фосфоенолпируват(ФЕП)-карбоксикиназа и трегалозофосфатсинтаза. Отметим, что наличие НДМА-зависимых алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ у грамотрицательных бактерий нами установлено впервые. НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы были обнаружены в 90-х годах XX ст. у некоторых грамположительных бактерий (*Mycobacterium gastri*, *Rhodococcus rhodochrous*, *R. erythropolis*, *Rhodococcus* sp. и *Amycolatopsis methanolica*) [16]. Это новый тип никотинопротеиновых (НАД(Ф)Н-содержащих) алкогольдегидрогеназ, в реакции выявления которых в качестве искусственного акцептора электронов используется 4-нитрозо-N,N-диметиланилин. Они содержат в качестве активного сайта связанный НАД(Ф)Н, который является кофактором, но не коферментом этих дегидрогеназ.

Цель данной работы – выявление возможных активаторов и ингибиторов ключевых ферментов  $C_2$ -метаболизма у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 с последующей модификацией состава среды культивирования для интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ.

**Материалы и методы.** Объект исследования – штамм *A. calcoaceticus* К-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером IMB В-7241.

Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л):  $KNO_3$  – 1,0, NaCl – 1,0,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  – 0,6,  $KH_2PO_4$  – 0,14,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,1, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8–7,0 (среда 1), а также на среде 2, аналогичной по составу среде 1, за исключением  $KNO_3$ . Вместо  $KNO_3$  в среде 2 использовали  $(NH_2)_2CO$  в эквимольной по азоту концентрации. В одном из вариантов в среду 2 дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [11]). В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1–2 % (по объему). Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48 ч), выращенная на средах указанного выше состава с 0,5 % этанола. 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 24–120 ч.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение ( $\sigma_s$ ) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ\*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости ( $E_{24}$ , %) определяли, как описано в наших предыдущих работах [2, 10, 11, 12].

Для получения бесклеточных экстрактов бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М  $K^+$ -фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М  $K^+$ -фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1 (Россия). Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность ПХХ-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.2.8, ранее КФ 1.1.99.8) и ПХХ-зависимой альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.99.3) определяли по восстановлению дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата при 600 нм с этанолом и ацетальдегидом как донором электронов соответственно. Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36) и ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.99) измеряли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-N,N-диметиланилина при 440 нм с этанолом

и ацетальдегидом как донорами электронов соответственно, как описано в наших предыдущих работах [1, 10, 12].

Активность ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1), изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1), цитратсинтазы (КФ 2.3.3.1, ранее КФ 4.1.3.7), аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37), сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1), фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2), оксалоацетатдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.3.), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4 и 1.4.1.2), ФЕП-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31), трегалозофосфатсинтазы (КФ 2.4.1.15) анализировали, как описано ранее [1, 2, 10, 12].

При проведении энзиматических анализов использовали реактивы фирмы «Merck» (Германия): этанол, ацетальдегид, додеканаль, феназинметасульфат; «Fluka» (Швейцария): НАД, уридин-5'-дифосфатглюкоза, коэнзим А; «Serva» (Германия): дихлорфенолиндофенол, лактатдегидрогеназа, АДФ, изоцитрат; остальные реактивы фирмы «Sigma» (США).

При исследовании влияния катионов калия, натрия и аммония на активность ферментов отмывание клеток, ультразвуковую обработку и определение активности ферментов осуществляли в 0,05 М трис-фосфатном буфере (рН 7,0). Концентрация катионов в реакционной смеси составляла 25, 50 и 100 мМ. Катионы вносили в реакционную смесь в виде 20 %-ных растворов KCl, NaCl и NH<sub>4</sub>Cl.

Содержание белка в бесклеточных экстрактах рассчитывали по Брэдфорд [6], активность ферментов определяли при 28–30°C – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB В-7241.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [1, 2, 10, 12]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В предыдущих наших работах [1, 2] было показано, что у *A. calcoaceticus* IMB В-7241, растущего на этаноле, функционирует неполный цикл трикарбоновых кислот (не обнаружена активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы), и в то же время выявлена высокая активность как изоцитратдегидрогеназы, так и изоцитратлиазы. Более того, несмотря на наличие ферментов глиоксилатного цикла, в клетках штамма IMB В-7241 обнаружена и дополнительная анаэробная реакция, катализируемая ФЕП-карбоксилазой. Такие результаты энзимологических исследований могут свидетельствовать о биосинтетической роли цикла трикарбоновых кислот у *A. calcoaceticus* IMB В-7241, в частности, его участии в образовании поверхностно-активных аминоклипоидов.

Для проверки этого предположения на первом этапе исследований анализировали активность НАД(Ф)<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы – фермента, катализирующего восстановительное аминирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы с образованием глутамата и принимающего участие в биосинтезе аминокислот глутаматного семейства (табл. 1). В табл. 1 представлены также данные об активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных гликолипоидов (трегалозомиколатов) у штамма IMB В-7241.

Полученные результаты (табл. 1) согласуются с нашими предыдущими данными [1] и свидетельствуют о высокой активности в клетках *A. calcoaceticus* IMB В-7241, выращенных на этаноле, НАДФ<sup>+</sup>-изоцитратдегидрогеназы (фермента цикла трикарбоновых кислот), изоцитратлиазы и ФЕП-карбоксилазы (ферментов двух различных анаэробных путей). Логичным подтверждением наличия такого набора ферментов (при отсутствии 2-оксоглутаратдегидрогеназы) явилась достаточно высокая (879 нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка) активность НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы (табл. 1). Таким образом, энзиматические исследования подтвердили способность штамма IMB В-7241 к синтезу поверхностно-активных аминоклипоидов.

Таблица 1

**Активность ферментов анаэробных реакций и биосинтеза  
поверхностно-активных веществ у *A. calcoaceticus* IMB В-7241**

Фермент	Активность (нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка) в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся	
	в начале экспоненциальной фазы	в конце экспоненциальной фазы
Изоцитратлиаза	540±27	478±23
ФЕП-карбоксилаза	556±27	467±23
ФЕП-карбоксикиназа	450±22	394±19
ФЕП-синтетаза	2173±108	1406±70
Трегалозофосфатсинтаза	0	46±2
НАДФ <sup>+</sup> -зависимая изоцитратдегидрогеназа	498±24	486±24
2-Оксоглутарат-дегидрогеназа	0	0
НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	879±44	855±42
НАД <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	0	0

**Примечания.** Продолжительность культивирования 24 и 72 ч (начало и конец экспоненциальной фазы роста соответственно). Табл. 1–3: культивирование осуществляли на среде 1, содержащей 1 % этанола.

В синтезе поверхностно-активных трегалозомиколатов у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 принимают участие оба ключевых фермента глюконеогенеза (табл. 1). Отметим, что к концу экспоненциальной фазы роста в клетках бактерий наблюдалось снижение активности ФЕП-синтетазы и увеличение трегалозофосфатсинтазной активности (табл. 1).

На следующем этапе исследовали влияние катионов калия, аммония и натрия на активность ключевых ферментов ассимиляции этанола у штамма IMB В-7241. Согласно предыдущим данным [1] окисление этанола и ацетальдегида у данных бактерий осуществляется ПХХ- и НДМА-зависимыми дегидрогеназами.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, с увеличением концентрации катионов калия в реакционной смеси наблюдалось существенное снижение активности ПХХ-зависимых ферментов. Так, в присутствии 100 мМ К<sup>+</sup> активность этих дегидрогеназ уменьшалась в 2,5–2,9 раза по сравнению с таковой без катионов. Активаторами ПХХ-зависимых дегидрогеназ оказались катионы аммония, причем по мере увеличения концентрации NH<sub>4</sub><sup>+</sup> активность этих ферментов также повышалась. Катионы натрия в концентрации 25 и 50 мМ повышали активность ПХХ-зависимой алкогольдегидрогеназы, в то время как при всех исследуемых концентрациях Na<sup>+</sup> наблюдалось снижение активности ПХХ-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы в 1,5 раза.

Отметим, что НДМА-зависимая алкогольдегидрогеназная активность практически не изменялась в присутствии всех изученных одновалентных катионов, а активность НДМА-ацетальдегиддегидрогеназы незначительно (в 1,2–1,3 раза) увеличивалась при наличии в реакционной смеси катионов калия и натрия (табл. 2).

Дальнейшие исследования показали, что активность ферментов цикла трикарбоновых кислот у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 практически не изменялась в присутствии катионов калия, натрия и аммония.

Таблица 2

**Влияние одновалентных катионов на активность ключевых ферментов окисления этанола у *A. calcoaceticus* IMB В-7241**

Фермент	Активность (нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка) при наличии в реакционной смеси									
	Без катионов	K <sup>+</sup> , мМ			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , мМ			Na <sup>+</sup> , мМ		
		25	50	100	25	50	100	25	50	100
ПХХ-зависимая алкоголь-дегидрогеназа	158±7	100±5	80±5	55±2	230±11	240±12	350±17	220±16	240±12	138±7
ПХХ-зависимая ацетальдегид-дегидрогеназа	85±4	53±3	40±2	34±2	190±9	205±10	200±10	54±3	57±3	57±3
НДМА-зависимая алкоголь-дегидрогеназа	178±9	170±8	180±9	178±9	180±9	171±8	173±8	181±9	190±9	182±9
НДМА-зависимая ацетальдегид-дегидрогеназа	51±2	62±3	62±3	63±3	50±2	47±2	48±2	66±4	66±3	63±3

**Примечания.** Активность определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч).

Данные по влиянию одновалентных катионов на активность ключевых ферментов биосинтеза поверхностно-активных веществ у штамма IMB В-7241 представлены в табл. 3. Наличие в реакционной смеси катионов калия, натрия и аммония во всем диапазоне исследуемых концентраций не сопровождалось существенным изменением активности изоцитратлиазы. Катионы калия не влияли на ФЕП-карбоксилазную активность, однако ингибировали активность глутаматдегидрогеназы и обоих ферментов глюконеогенеза.

Катионы аммония оказались активаторами ФЕП-карбоксикиназы, ФЕП-карбоксилазы и НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы. Так, например, при 50 мМ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> активность последнего фермента увеличивалась более чем в 2 раза (табл. 3). Отметим, что внесение в реакционную смесь катионов аммония не сопровождалось существенным изменением активности ФЕП-синтетазы.

В присутствии всех исследуемых концентраций NH<sub>4</sub><sup>+</sup> наблюдали снижение в 1,2–1,3 раза ФЕП-синтетазной активности, однако катионы аммония практически не влияли на активность НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы, ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-карбоксилазы (табл. 3).

Данные по влиянию одновалентных катионов на активность ключевых ферментов C<sub>2</sub>-метаболизма у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 свидетельствуют о том, что большинство из исследуемых ферментов ингибировалось катионами калия и активировалось катионами аммония (табл. 2 и 3). В связи с этим предположили, что снижение в среде культивирования содержания K<sup>+</sup> и повышение концентрации NH<sub>4</sub><sup>+</sup> может сопровождаться интенсификацией метаболических процессов в клетках данных бактерий. С этой целью нитрат калия в среде заменили на эквивалентную по азоту концентрацию мочевины. При этом концентрация K<sup>+</sup> в среде снизилась до 1 мМ, а концентрация аминного азота увеличилась до 10 мМ.

На следующем этапе анализировали активность ключевых ферментов C<sub>2</sub>-метаболизма при культивировании штамма IMB В-7241 на исходной (среда 1) и модифицированной среде 2 (табл. 4). Внесение дрожжевого автолизата и микроэлементов в модифицированную среду осуществляли в связи с тем, что в предыдущих исследованиях было установлено их стимулирующее влияние на синтез ПАВ [11].

Таблица 3

**Изменение активности ключевых ферментов синтеза ПАВ у *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в присутствии одновалентных катионов**

Фермент	Активность (нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка) при наличии в реакционной смеси									
	Без катионов	K <sup>+</sup> , мМ			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , мМ			Na <sup>+</sup> , мМ		
		25	50	100	25	50	100	25	50	100
НАДФ <sup>+</sup> -глутаматдегидрогеназа	833±42	733±36	714±35	595±30	933±46	1786±89	938±46	885±44	631±31	531±26
ФЕП-синтетаза	2230±111	1880±94	1654±82	1504±75	1929±96	1978±98	2008±100	1677±84	1677±84	1902±45
ФЕП-карбоксикиназа	430±21	287±14	Н.о.	287±14	480±24	580±29	650±32	487±24	465±23	448±22
ФЕП-карбоксилаза	660±33	694±35	646±32	646±32	833±42	756±38	690±34	717±36	722±36	724±36
Изоцитратлиаза	576±25	513±21	Н.о.	556±28	550±28	Н.о.	Н.о.	556±28	556±28	Н.о.

**Примечания.** Активность определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч). Н.о. – не определяли

Как видно из представленных в табл. 4 данных, при культивировании бактерий на среде с мочевиной наблюдали увеличение в 1,3–2,5 раза активности большинства исследованных ферментов по сравнению с таковой на среде с нитратом калия. Так, активность ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы повысилась в 2,5, обеих ацетальдегиддегидрогеназ – в 2, ФЕП-синтетазы – в 1,7, ПХХ-зависимой алкогольдегидрогеназы, ацетил-КоА-синтетазы и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы – в 1,3–1,4 раза.

Отметим, что внесение дрожжевого автолизата и микроэлементов в среду с мочевиной не сопровождалось существенным повышением активности исследуемых ферментов (табл. 4). Тем не менее, и в этом случае активность всех ферментов, за исключением оксалоацетатдекарбоксилазы, была значительно выше, чем на исходной среде 1.

Показатели синтеза ПАВ при культивировании штамма IMB В-7241 на исходной и модифицированной средах представлены в табл. 5. Условная концентрация ПАВ и индекс эмульгирования на среде, содержащей в качестве источника азота мочевины, были соответственно в 2 и 1,5 раза выше, чем на среде с нитратом калия. В то же время при наличии в модифицированной среде дрожжевого автолизата и микроэлементов не наблюдали повышения синтеза ПАВ по сравнению с культивированием бактерий на среде 2.

Таблица 4

**Активность ключевых ферментов C<sub>2</sub>-метаболизма в различных условиях культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241**

Фермент	Активность (нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка) при культивировании на		
	среде 1 с KNO <sub>3</sub>	среде 2 с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO	среде 2 с дрожжевым автолизатом и микроэлементами
ПХХ-зависимая* алкогольдегидрогеназа	158±7	222±11	214±10
ПХХ-зависимая* ацетальдегиддегидрогеназа	85±4	172±8	126±6
НДМА-зависимая* ацетальдегиддегидрогеназа	51±2	98±5	76±4
Ацетил-КоА-синтетаза	36±2	48±3	57±3
Изоцитратлиаза	576±25	588±27	690±35
Ацетаткиназа	103±5	120±6	116±6
Оксалоацетатдекарбоксилаза	182±9	Н.о.	140±7
НАДФ <sup>+</sup> -зависимая изоцитратдегидрогеназа	480±24	523±26	545±27
НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	833±42	1100±55	1241±62
НАД <sup>+</sup> -зависимая малатдегидрогеназа	492±24	Н.о.	885±44
ФЕП-синтетаза	2230±111	3856±192	3716±185
ФЕП-карбоксикиназа	430±21	1075±53	978±49
ФЕП-карбоксилаза	660±33	1660±78	1484±74

**Примечания.** Активность определяли в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч). «Н.о.» – не определяли. \* – активность ферментов измерена в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч).

Таблица 5

**Влияние условий культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на накопление биомассы и синтез ПАВ**

Условия культивирования	Биомасса, г/л	Условная концентрация ПАВ	Индекс эмульгирования, %
Среда 1	1,3±0,06	2,0±0,1	40±2
Среда 2	1,6±0,08	4,0±0,2	60±3
Среда 2 с дрожжевым автолизатом и микроэлементами	1,8±0,09	3,8±0,19	60±3

**Примечания.** Длительность культивирования 120 ч. Содержание этанола в средах 2 % (по объему).

Таким образом, на основе энзимологических исследований нам удалось модифицировать состав питательной среды для культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241, что в свою очередь дало возможность повысить в два раза условную концентрацию синтезированных поверхностно-активных веществ.

**Обсуждение.** Известно, что одним из способов интенсификации технологий микробного синтеза является определение сайтов метаболического лимитирования и разработка подходов к их устранению [3].

Чаще всего исследователи для компенсации «узких мест» метаболизма используют методы метаболической инженерии – получение рекомбинантных штаммов с повышенной экспрессией генов, ответственных за синтез ферментов, катализирующих скорость-лимитирующие реакции.

На сегодняшний день достигнуты значительные успехи в метаболической инженерии микроорганизмов – продуцентов олиго- и полисахаридов [14]. Многообещающими являются первые результаты в получении с помощью рекомбинантных штаммов гиалуроновой кислоты [17] и альгината с заданными свойствами [14]. С использованием методов метаболической инженерии удалось повысить количество синтезированных микроорганизмами антибиотиков [15], каротиноидов [7], аминокислот [9], спиртов (ксилитол, маннитол, сорбитол) [4], биотоплива [8].

Наши предыдущие исследования [3] показали, что существует более простой и не менее эффективный способ устранения «узких» мест метаболизма: увеличение активности скорость-лимитирующей реакции изменением состава питательной среды (исключение ингибиторов и повышение концентрации активаторов фермента, катализирующего эту реакцию). Использование таких приемов позволяет не только повысить количество синтезированного целевого продукта, но и минимизировать состав питательной среды, а также интенсифицировать процесс микробного синтеза (сократить продолжительность культивирования, повысить скорость синтеза целевого продукта и сместить время ее достижения в более раннюю ростовую фазу и др.).

Так, исследование особенностей  $C_2$ -метаболизма у *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 (продуцент микробного экзополисахарида этаполана) показало, что «узким» местом метаболизма этанола является ассимиляция ацетата, о чем свидетельствовало ингибирование ионами натрия как окисления ацетата интактными клетками, так и активности ацетил-КоА-синтетазы в бесклеточном экстракте, а также лимитирование  $C_2$ -метаболизма коэнзимом А [3]. Установлено, что кроме катионов натрия, ингибиторами ацетил-КоА-синтетазы являются интермедиаты окисления этанола и ацетальдегида (НАДН и НАДФН), а активаторами – катионы калия и магния. Исключение  $Na^+$  из состава среды культивирования штамма IMB B-7005 и повышение содержания катионов калия позволили устранить лимитирование  $C_2$ -метаболизма и повысить активность ацетил-КоА-синтетазы в 3 раза, а также реализовать процесс синтеза этаполана на незабуференной среде, в которой содержание солей было снижено в 4 раза (до 2,95 г/л) [3].

Показана возможность устранения лимитирования  $C_2$ -метаболизма в условиях миксотрофного роста *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на смеси  $C_2$ - $C_6$ -субстратов повышением в среде концентрации активаторов ацетил-КоА-синтетазы (пантотената,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ), использованием инокулята, выращенного на этаноле или ацетате, дробным внесением субстратов порциями по 0,25 % в процессе культивирования бактерий [3].

Другим подходом к интенсификации технологий микробного синтеза, базирующемся на исследовании особенностей метаболизма штамма-продуцента, является выявление возможных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов метаболизма с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды.

Так, изучение особенностей метаболизма *n*-гексадекана у продуцента поверхностно-активных веществ *R.erythropolis* IMB Ac-5017 позволило установить условия культивирования бактерий, обеспечивающих повышение в 4 раза синтеза ПАВ [3, 12]. Установлено, что у штамма IMB Ac-5017 катионы калия являются ингибиторами алкангидроксилазы и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой альдегиддегидрогеназы, а катионы натрия – активаторами этих ферментов. Снижение в среде с *n*-гексадеканом концентрации  $K^+$  до 1 мМ, повышение содержания  $Na^+$  до 35 мМ, внесение 36 мкмоль/л  $Fe^{2+}$ , необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увели-



чением активности ключевых ферментов метаболизма *n*-гексадекана, а также повышением количества синтезированных поверхностно-активных веществ.

Отметим, что в отличие от *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, у *R.erythropolis* IMB Ac-5017 «узкие» места метаболизма, т.е. явно выраженные скорость-лимитирующие реакции, выявлены не были.

Результаты данной работы показали, что у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 катионы калия являются ингибиторами ключевых ферментов метаболизма этанола (ПХХ-зависимых алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ), а также ферментов биосинтеза поверхностно-активных аминоллипидов (НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы) и гликолипидов (ФЕП-синтетазы и ФЕП-карбоксикиназы). Активаторами этих ферментов являются катионы аммония. Однако используемый нами ранее подход (исключение или снижение в среде культивирования *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 и *R.erythropolis* IMB Ac-5017 концентрации ингибиторов и повышение содержания активаторов ключевых ферментов метаболизма этанола и гексадекана соответственно) не привел к желаемому результату в случае модификации питательной среды для выращивания *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Замена нитрата калия на эквивалентную по азоту концентрацию аммонийного источника азотного питания (сульфат, хлорид или нитрат аммония) сопровождалась не ожидаемым повышением, а снижением показателей роста и синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [2]. И только использование мочевины в качестве источника азота в составе среды культивирования штамма IMB B-7241 дало возможность повысить активность ключевых ферментов метаболизма этанола и биосинтеза ПАВ. В таких условиях культивирования наблюдали также повышение концентрации синтезированных поверхностно-активных веществ. В нашей предыдущей работе [2] мы объясняли такие необычные результаты проблемами транспорта катионов аммония в клетки *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

При исследовании особенностей метаболизма штамма IMB B-7241, растущего на этаноле, мы установили еще один интересный факт. Оказалось неожиданным, что, несмотря на наличие ферментов гликозилатного цикла, в клетках бактерий обнаружена достаточно высокая активность ФЕП-карбоксилазы – фермента анаплеротического пути, восполняющего пул C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот при росте микроорганизмов на углеводных субстратах [1, 2]. В работе [2] мы предположили, что физиологическая роль ФЕП-карбоксилазы при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде с этанолом и мочевиной состоит в обезвреживании углекислого газа, образуемого в уреазной реакции. Это сопровождается повышением в клетках бактерий пула C<sub>4</sub>-дикарбоновых кислот, усилением глюконеогенеза и увеличением синтеза поверхностно-активных гликолипидов.

При изучении влияния условий культивирования на образование ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 было установлено, что внесение в среду с этанолом дрожжевого автолизата и микроэлементов сопровождалось повышением показателей синтеза ПАВ [11]. В то же время результаты энзиматических исследований, представленные в настоящей работе, не подтверждают полученных ранее данных. Так, нами не обнаружено существенного положительного влияния дрожжевого автолизата и микроэлементов в среде культивирования штамма IMB B-7241 на активность ключевых ферментов биосинтеза ПАВ. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что замена в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 нитрата калия на эквивалентную по азоту концентрацию мочевины сопровождалась повышением в 2 раза синтеза ПАВ, что обусловлено увеличением в таких условиях культивирования штамма активности ключевых ферментов метаболизма этанола (ПХХ- и НДМА-зависимых ацетальдегиддегидрогеназ) и биосинтеза ПАВ (НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы, ФЕП-карбоксилазы, ФЕП-синтетазы и ФЕП-карбоксикиназы).

*Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, С.І. Антонюк<sup>1</sup>, Є.Ю. Кравченко<sup>1</sup>, Г.О. Іутинська<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій, Київ

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

**ВПЛИВ ОДНОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА СИНТЕЗ  
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН  
*ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241**

**Резюме**

Досліджено вплив одновалентних катіонів на активність ключових ферментів C<sub>2</sub>-метаболізму у продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, вирощеного на етанолі.

Встановлено, що катіони калію є інгібіторами піролохінолінхінон-залежних алкоголь- і ацетальдегіддегідрогеназ, ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів (НАДФ<sup>+</sup>-залежної глутаматдегідрогенази) і гліколіпідів (фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксикінази), а катіони амонію – активаторами цих ферментів і ФЕП-карбоксилази. Зниження у середовищі культивування концентрації катіонів калію до 1 мМ і підвищення вмісту амінного азоту до 10 мМ в результаті заміни нітрату калію на еквімолярну за азотом концентрацію сечовини супроводжувалося збільшенням активності ферментів метаболізму етанолу і біосинтезу ПАР, а також підвищенням у 2 рази умовної концентрації поверхнево-активних речовин.

**Ключові слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, метаболізм етанолу, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, ключові ферменти.

*T.P. Pirog<sup>1,2</sup>, T.A. Shevchuk<sup>2</sup>, S.I. Antonyuk<sup>1</sup>, Ye. Yu. Kravchenko<sup>1</sup>, H.O. Iutynska<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> National University of Food Technologies, Kyiv

<sup>2</sup> Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**EFFECT OF UNIVALENT CATIONS ON SYNTHESIS  
OF SURFACTANTS  
BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241**

**Summary**

The effect of univalent cations on activity of key enzymes of C<sub>2</sub>-metabolism has been investigated in the producer of biosurfactants, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 grown on ethanol. It was established that potassium cations are inhibitors of pyroquinolinequinone-dependent alcohol- and acetaldehyde dehydrogenases, the enzymes of biosynthesis of surface-active aminolipids (NADP-dependent glutamate dehydrogenase) and glycolipids (phosphoenolpyruvate(PhEP)-carboxylase), while ammonium cations are activators of these enzymes and PhEP-carboxylase. A decrease of potassium cations concentration in the cultivation medium to 1 mM and increase of the content of amine nitrogen to 10 mM as a result of potassium nitrate substitution by equimolar, as to nitrogen, urea concentration were accompanied by the increase of activity of enzymes of ethanol metabolism and SAS biosynthesis, as well as by the 2-fold increase of conditional concentration of the biosurfactants.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, ethanol metabolism, biosynthesis intensification, biosurfactants, key enzymes.

**The authors' address:** Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугинец О.С. Особенности окисления этанола у продуцента поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Микробиол. журн. – 2010. – **72**, № 6. – С. 3–10.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долощенко Е.Ю. Роль фосфоенолпируваткарбоксилазы в синтезе поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Микробиол. журн. – 2011. – **73**, № 3. С. 9–15.
3. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – Киев: Наук. думка, 2010. – 327 с.
4. Akinterinwa O., Khankal R. Cirino P. C. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols // Cur. Opinion Biotechnol. – 2008. – **19**, N 5 – P. 461–467.
5. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**, N 5. – P. 2608–2615.
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**, № 3. – P.248–254.
7. Klein-Marcuschamer, Ajikumar P.K., Stephanopoulos G. Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene // Trends Biotechnol. – 2007. – **25**, N 9. – P. 417–424.
8. Mukhopadhyay A., Redding A. M., Rutherford B. J., Keasling J. D. Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production // Cur. Opinion Biotechnol. – 2008. – **19**, N 3. – P. 228–234.
9. Park J. H., Lee S.Y. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production //Ibid. – 2008. – **19**, N 5. – P. 454–460.
10. 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. – **77**, N 6. – P. 665–673.
11. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – **45**, N 3. – P. 272–278.
12. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – **46**, N 6. – P. 599–606.
13. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 2. – P. 154–162.
14. Ruffing A., Chen R.R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis // Microbial Cell Factories. – 2006. – **5**. – P. 25–33.
15. Stack D., Neville C., Doyle S. Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi // Microbiology. – 2007. – **153**, N 5. – P. 1297–1306.
16. Van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J. A. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // Eur. J. Biochem. – 1993. – **212**, N 3. – P. 819–826.

Отримано 10.06.2012