

ISSN 1029-8940 (print)  
УДК 759.873.088.5:661.185

Поступила в редакцию 27.12.2016  
Received 27.12.2016

Т. П. Пирог<sup>1,2</sup>, Т. А. Шевчук<sup>2</sup>, И. В. Савенко<sup>1</sup>, Д. А. Луцай<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

## ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ НАДФ<sup>+</sup>-ЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У БАКТЕРИЙ РОДОВ *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* И *NOCARDIA* – ПРОДУЦЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

**Аннотация.** Биологические свойства микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) обуславливают их возможное практическое использование в качестве антимикробных агентов. По химической природе ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 являются комплексом нейтральных, глико-, фосфо- и аминокислот. Согласно данным литературы, аминокислоты характеризуются наиболее высокой антимикробной активностью. Ключевым ферментом биосинтеза аминокислот у штаммов IMB B-7241, IMB B-7405 и IMB Ac-5017 является НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа. Предполагается, что выявление возможных активаторов и/или ингибиторов этого фермента с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды позволит регулировать состав комплекса ПАВ и его свойства.

Целью работы было исследование влияния одно- и двухвалентных катионов на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Культивирование штаммов IMB B-7241, IMB Ac-5017 и IMB B-7405 осуществляли в жидкой минеральной среде, содержащей этанол и глицерин в качестве источника углерода. Активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4) в бесклеточном экстракте анализировали по образованию глутамата в процессе окисления НАДФН при 340 нм.

Установлено, что активаторами НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 являются катионы кальция (5 мМ), магния (10 мМ) и цинка (0,001–0,01 мМ), у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 – катионы кальция (5 мМ), у *N. vaccinii* IMB B-7405 – катионы кальция (5 и 10 мМ), натрия (25–100 мМ) и калия (50 и 100 мМ). Дополнительное внесение активаторов фермента или увеличение их содержания в среде культивирования исследуемых штаммов сопровождалось повышением активности НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы в 1,5–3 раза по сравнению с таковой на базовой среде.

Полученные данные предполагают возможность регуляции свойств микробных ПАВ в процессе культивирования продуцента, что в перспективе позволит получать препараты со стабильными заданными свойствами в зависимости от сферы их практического применения.

**Ключевые слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, активаторы НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы

**Для цитирования:** Влияние катионов на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у бактерий родов *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и *Nocardia* – продуцентов поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 67–74.

T. P. Pirog<sup>1,2</sup>, T. A. Shevchuk<sup>2</sup>, I. V. Savenko<sup>1</sup>, D. A. Lutsai<sup>1</sup>

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

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

## INFLUENCE OF CATIONS ON NADP<sup>+</sup>-DEPENDENT GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BACTERIA OF GENERA *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* AND *NOCARDIA* – PRODUCERS OF SURFACTANTS

**Abstract.** Surfactants of microbial origin are widely used in different industries. The application of microbial surfactants is promising in biology and medicine as an alternative to synthetic disinfectants or drugs due to their antimicrobial and anti-adhesive properties. The key enzyme biosynthesis of surface active aminolipids (effective antimicrobials preparations) in *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 is NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase.

Aim – to study the effect of mono- and divalent cations on the activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405.

The activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4) in the cell-free extract was analyzed for the formation of glutamate in the oxidation of NADPH at 340 nm.

It was found that activators of this enzyme in *A. calcoaceticus* IMV B-7241 were calcium cations (5 mM), magnesium (10 mM) and zinc (0.001–0.01 mM), *R. erythropolis* IMV Ac-5017 – calcium (5 mM), *N. vaccinii* IMV B-7405 – calcium (5 and 10 mM), sodium (25–100 mM), potassium (50 and 100 mM). Additional introduction or increase the content of enzyme activators in cultivation medium of studied strains was accompanied by increasing activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase in 1.5–3 times compared with that in the base medium.

The possibility of regulating biological properties of final product during cultivation of surfactants producer are discussed. The obtained results suppose modification of microbial surfactants characteristics with the change in cultivation medium of cations content – activators and/or inhibitors of key enzymes biosynthesis of component surfactants responsible for specific biological properties.

**Keywords:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, activators of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase

**For citation:** Pirog T. P., Shevchuk T. A., Savenko I. V., Lutsai D. A. Influence of cations on NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase activity in bacteria of genera *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Nocardia* – producers of surfactants. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 67–74 (in Russian).

**Введение.** Интерес исследователей к нетоксичным биодegradабельным микробным поверхностно-активным веществам (ПАВ) обусловлен широким спектром их возможного практического использования, в том числе в медицине [1]. Повышение резистентности микроорганизмов к антибиотикам и другим биоцидам способствовало поиску новых эффективных антимикробных средств [2]. На сегодняшний день используются альтернативные антибиотикам препараты биологического происхождения (пробиотики, бактериофаги, ферменты) и активно исследуются новые потенциальные биоциды (микробные ПАВ, пептиды, бактериоцины, лектины и др.) [3, 4]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся антимикробной активности микробных ПАВ, применение этих продуктов микробного синтеза в медицине остается весьма ограниченным [4]. Коммерческим аминоклипом является даптомицин, производимый Cubist Pharmaceuticals под названием Cubicin® [5]. Этот препарат был одобрен в 2003 г. для лечения кожных инфекций, вызванных метициллин-резистентным золотистым стафилококком и другими грамположительными патогенными микроорганизмами.

Ранее нами показано [6], что штаммы *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 способны синтезировать ПАВ, обладающие антимикробной активностью.

В работах [7, 8] установлена зависимость антимикробных свойств ПАВ *N. vaccinii* IMV B-7405 и *A. calcoaceticus* IMV B-7241 от условий культивирования продуцентов. Это может быть обусловлено тем, что микробные ПАВ являются вторичными метаболитами и, как правило, синтезируются в виде комплекса подобных соединений [1], соотношение которых может изменяться в различных условиях культивирования продуцентов, что сопровождается изменением биологических свойств целевого продукта.

По химической природе ПАВ *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 и *R. erythropolis* IMV Ac-5017 являются комплексом нейтральных, глико-, фосфо- и аминоклипов [9]. Согласно литературным данным [4, 10], аминоклипы являются более эффективными антимикробными агентами, чем гликолипы, а нейтральные и фосфолипиды характеризуются очень слабой антимикробной активностью. Следовательно, повышенное содержание в составе комплекса аминоклипов может сопровождаться усилением антимикробной активности ПАВ. Однако на сегодняшний день влияние условий культивирования продуцента на биологические свойства ПАВ и возможность их регуляции остается вне внимания исследователей, хотя первые работы, в которых представлены данные о взаимосвязи химического состава микробных ПАВ и их свойств, были опубликованы около 15 лет назад [11]. Тем не менее, в работе [12] отмечается, что биосинтез аминоклипов с заранее заданными свойствами невозможен, а достичь этого можно только в результате постферментационной химической модификации синтезированных ПАВ.

По нашему мнению, выявление возможных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза компонентов ПАВ с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды позволит регулировать состав комплекса ПАВ, а следовательно, и свойства целевого продукта. Ранее установлено [13–15], что ключевым ферментом биосинтеза аминокли-

пидов у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 является НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа.

Цель данной работы – исследовать влияние одно- и двухвалентных катионов на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

**Объекты и методы исследования.** Объекты исследования – штаммы *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Nocardia vaccinii* К-8, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номерами IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 соответственно.

*R. erythropolis* IMB Ac-5017 выращивали в жидкой минеральной среде (г/л): NaNO<sub>3</sub> – 1,3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; NaCl – 1,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,6; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,14; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl<sub>2</sub> в концентрации 0,1 г/л. В качестве субстрата использовали этанол в концентрации 1 % (по объему).

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO – 0,35; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; NaCl – 1,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,6; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,14; Cu<sup>2+</sup> (0,16 мкМ) в виде раствора CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O с концентрацией 4 мг/100 мл и Fe<sup>2+</sup> (3,6 мкМ) в виде 1 %-ного раствора FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl<sub>2</sub> в концентрации 0,1 и 0,2 г/л, а также Zn<sup>2+</sup> (38 мкМ) в виде раствора ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O с концентрацией 1,1 г/100 мл. Источник углерода – этанол в концентрации 1 % (по объему).

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали в синтетической питательной среде (г/л): NaNO<sub>3</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; CaCl<sub>2</sub> – 0,1; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) (базовая среда). В одном из вариантов содержание CaCl<sub>2</sub> в среде повышали до 0,2 и 0,4 г/л. Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1,0 % (по объему).

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на соответствующих базовых средах, содержащих 0,5 % (по объему) субстрата. Количество посеваемого материала (10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> кл/мл) составляло 5–10 % от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30 °С в течение 24–48 ч.

Для получения бесклеточных экстрактов культуральную жидкость после культивирования исследуемых штаммов центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12 000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4) анализировали по образованию глутамата при окислении НАДФН при 340 нм [16]. При исследовании влияния катионов на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы в реакционную смесь вносили 0,001–0,01 мМ Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> в виде растворов солей MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, а также 0,01–10 мМ Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и 25–100 мМ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> в виде растворов солей CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl и KCl соответственно.

Активность ферментов выражали в нмоль полученного за 1 мин продукта реакции (НАДФ) в пересчете на 1 мг белка. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Bradford. Активность ферментов анализировали при 28–30 °С – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [13–15]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 представлены данные по зависимости активности НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Таблица 1. Влияние катионов на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017Table 1. Influence of cations on the activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017

Катион	Концентрация в реакционной смеси, мМ	Активность в клетках штаммов, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка		
		IMB B-7241	IMB B-7405	IMB Ac-5017
Без катионов	0	345 ± 17	476 ± 23	236 ± 11
Ca <sup>2+</sup>	0,01	Н. о.	794 ± 39	Н. о.
	5	431 ± 21	635 ± 32	353 ± 17
	10	517 ± 25	794 ± 39	117 ± 5
Mg <sup>2+</sup>	0,01	310 ± 15	450 ± 22	Н. о.
	5	345 ± 17	464 ± 23	118 ± 6
	10	517 ± 25	476 ± 23	59 ± 3
Mn <sup>2+</sup>	0,001	340 ± 17	159 ± 8	59 ± 3
	0,005	344 ± 17	140 ± 7	236 ± 11
	0,01	310 ± 15	240 ± 12	118 ± 6
Zn <sup>2+</sup>	0,001	580 ± 29	238 ± 11	59 ± 3
	0,005	580 ± 29	238 ± 11	59 ± 3
	0,01	397 ± 19	159 ± 8	59 ± 3
Co <sup>2+</sup>	0,001	340 ± 17	238 ± 11	59 ± 3
	0,005	344 ± 17	238 ± 11	59 ± 3
	0,01	345 ± 17	159 ± 8	59 ± 3
Na <sup>+</sup>	25	305 ± 15	635 ± 31	174 ± 8
	50	290 ± 14	635 ± 31	174 ± 8
	100	189 ± 9	1111 ± 55	194 ± 9
K <sup>+</sup>	25	345 ± 17	Н. о.	209 ± 10
	50	289 ± 14	794 ± 39	236 ± 11
	100	245 ± 12	1111 ± 55	236 ± 11

Примечание. Активность ферментов определяли в клетках бактерий, выращенных до середины экспоненциальной фазы. Н. о. – не определяли.

и *N. vaccinii* IMB B-7405 от концентрации различных одно- и двухвалентных катионов в реакционной смеси. Выбор катионов обусловлен тем, что, согласно литературным данным [17–22], они (в исследуемом нами диапазоне концентраций) являются ингибиторами или активаторами НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у различных микроорганизмов.

Так, у архей *Thermococcus* sp. активность этого фермента повышалась на 135, 104 и 250 % в присутствии 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> и MnCl<sub>2</sub> соответственно [17]. Позже [18] было установлено, что катионы кальция и магния являются активаторами НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы и у архей *Thermococcus waiotapuensis*: при наличии 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgSO<sub>4</sub> наблюдали увеличение активности в 1,3 раза по сравнению с таковой без катионов металлов. У аэробных гипертермофильных архей *Aeropyrum pernix* K1 активаторами фермента являются катионы калия и натрия в концентрации 50–200 мМ [19].

Данные о влиянии катионов цинка на активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у микроорганизмов появились в 1980 г. [20], однако до настоящего времени в литературе имеются лишь отдельные такие сообщения. В работе [20] отмечается, что в зависимости от концентрации Zn<sup>2+</sup> может быть либо активатором, либо ингибитором этого фермента: при концентрации менее 0,1 мМ активность глутаматдегидрогеназы у *Mycobacterium smegmatis* повышалась, а при концентрации катионов цинка более 0,1 мМ наблюдали ингибирование активности фермента. В присутствии 1 мМ Zn<sup>2+</sup> активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у *Escherichia coli* снижалась на 40 % [21], повышение концентрации ZnCl<sub>2</sub> до 5 мМ сопровождалось ингибированием активности этого фермента у *Aspergillus terreus* [22].

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что катионы кальция в концентрации 5 мМ являются активатором НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы у всех исследуемых штаммов (увеличение активности в 1,3–1,5 раза). Повышение концентрации Ca<sup>2+</sup> до 10 мМ в реакционной смеси со-

провождалось увеличением в 1,2–1,3 раза активности фермента у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и у *N. vaccinii* IMB B-7405 и ее снижением в 3 раза у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (по сравнению с его активностью в присутствии 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ ). Отметим, что активирующее влияние катионов кальция на глутаматдегидрогеназу *N. vaccinii* IMB B-7405 проявлялось в широком диапазоне концентраций (0,01–10 мМ).

В отличие от катионов кальция, в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$  (10 мМ) и  $\text{Zn}^{2+}$  (0,001–0,01 мМ) увеличение глутаматдегидрогеназной активности наблюдали только у штамма *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Активаторами фермента, функционирующего у *N. vaccinii* IMB B-7405, оказались катионы калия и натрия. Активность НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ингибировали катионы марганца, цинка и кобальта (табл. 1).

На основании полученных данных предположили, что глутаматдегидрогеназную активность в клетках бактерий можно повысить путем внесения в среду культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 катионов цинка и кальция, повышения концентрации катионов магния, а также добавления в среду для выращивания *R. erythropolis* IMB Ac-5017  $\text{Ca}^{2+}$  и увеличения концентрации этих катионов в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405.

Дальнейшие эксперименты подтвердили наше предположение (табл. 2, см. рисунок). Так, при наличии в среде  $\text{Zn}^{2+}$  (38 мкМ),  $\text{Mg}^{2+}$  (0,2 и 0,4 г/л),  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 и 0,2 г/л) активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы в клетках *A. calcoaceticus* IMB B-7241 повышалась в 2–3 раза по сравнению с активностью на базовой среде без катионов цинка и кальция и с более низкой концентрацией катионов магния (табл. 2). Повышение в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 содержания  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,4 г/л сопровождалось увеличением глутаматдегидрогеназной активности в 1,5 раза (см. рисунок). При дополнительном внесении  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 г/л) в среду для выращивания *R. erythropolis* IMB Ac-5017 наблюдали повышение активности фермента почти в 2 раза.

Таблица 2. Активность НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в зависимости от концентрации катионов цинка, магния и кальция в среде культивирования

Table 2. The activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase *A. calcoaceticus* IMB B-7241 depending on the concentration of the cations of zinc, magnesium and calcium in cultivation medium

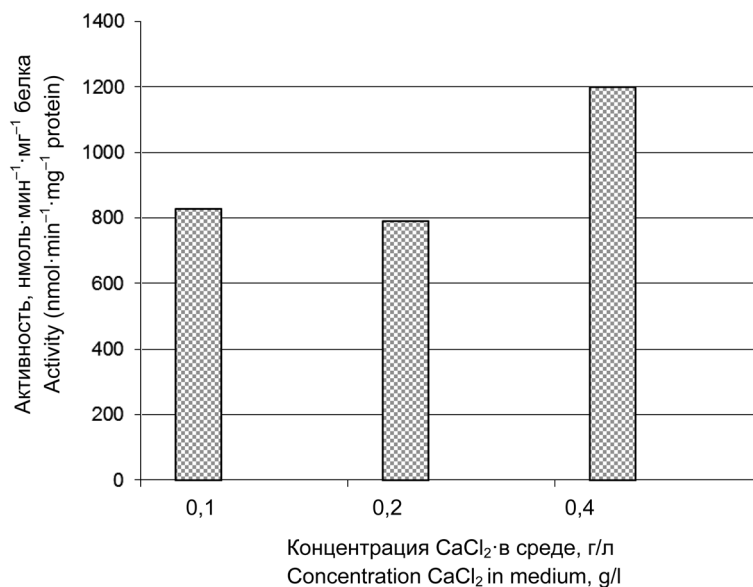
Концентрация катионов в среде культивирования, г/л			Активность, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	
0*	0,1*	0*	380 ± 19
0	0,2	0	1140 ± 57
0	0,4	0	956 ± 47
0	0,1	0,1	920 ± 46
0	0,1	0,2	734 ± 36
38 мкМ	0,1	0	897 ± 45

Примечание. \* – контроль (базовая среда).

Отметим, что реальное содержание катионов в клетках бактерий отличается от их концентрации в среде культивирования, а величина ферментативной активности в бесклеточном экстракте не всегда соответствует скорости реального процесса в интактных клетках, которая зависит не только от содержания фермента, но и от пула субстратов, регуляции фермента и т. д. Тем не менее, внесение в питательную среду активаторов или повышение их концентрации позволило увеличить активность НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы у исследуемых штаммов.

Аналогичный прием был использован нами ранее для интенсификации синтеза микробного полисахарида этаполана на этаноле и ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на *n*-гексадекане [13].

Так, исследование особенностей C<sub>2</sub>-метаболизма у *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 (продуцент этаполана) показало, что ацетил-КоА-синтетазная реакция является скоростью-лимитирующей. Исключение Na<sup>+</sup> (ингибитор фермента) из состава среды культивирования штамма IMB B-7005 и повышение содержания катионов калия (активатор) позволили устранить лимитирование C<sub>2</sub>-метаболизма и повысить активность ацетил-КоА-синтетазы в 3 раза, а также запустить процесс синтеза этаполана на незабуференной среде, содержание солей в которой снижено в 4 раза (до 2,95 г/л).



Активность НАДФ<sup>+</sup>-глутаматдегидрогеназы *N. vaccinii* IMB B-7405 в зависимости от концентрации катионов кальция в среде культивирования

The activity of NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase *N. vaccinii* IMV B-7405 depending on the concentration of calcium cations in cultivation medium

Изучение метаболизма *n*-гексадекана у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 позволило определить условия культивирования бактерий, обеспечивающие повышение синтеза ПАВ в 4 раза. 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<sup>+</sup> до 1 мМ, повышение содержания Na<sup>+</sup> до 35 мМ, внесение 36 мкМ Fe<sup>2+</sup>, необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увеличением активности ключевых ферментов метаболизма *n*-гексадекана, а также повышением количества синтезированных ПАВ.

**Заключение.** Результаты, представленные в настоящей работе, подтверждают полученные ранее данные о возможности повышения активности ключевых ферментов биосинтеза целевого продукта в результате модификации состава питательной среды путем изменения в ней содержания активаторов (ингибиторов) этих ферментов. Вполне вероятно, что результатом такой активации ключевых ферментов может быть не только интенсификация синтеза целевого продукта (как установлено нами ранее [13]), но и регуляция его биологических свойств, что в перспективе позволит получать продукты со стабильными, заранее заданными, в зависимости от сферы их практического использования, свойствами.

Кроме того, полученные результаты указывают на необходимость проведения исследований по влиянию условий культивирования продуцентов на биологические свойства синтезированных целевых продуктов микробного синтеза.

#### Список использованных источников

1. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century / D. K. Santos [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17.
2. Fair, R. J. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century / R. J. Fair, Y. Tor // Perspect. Med. Chem. – 2014. – Vol. 6. – P. 25–64.
3. Demain, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery / A. L. Demain // J. Ind. Microbiol. Biotech. – 2014. – Vol. 41, N 2. – P. 185–201.
4. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds / L. Fracchi [et al.] // Bioengineering. – 2015. – Vol. 2, N 3. – P. 144–162.
5. Robbel, L. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery / L. Robbel, M. A. Marahiel // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, N 36. – P. 27501–27508.
6. Пирог, Т. П. Использование микробных поверхностно-активных веществ в биологии и медицине / Т. П. Пирог, А. Д. Конон, А. Б. Скочко // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 24–38.

7. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants / T. P. Pirog [et al.] // *Biotechnologia acta*. – 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 38–47.
8. Антимикробные свойства поверхностно-активных веществ, синтезированных в различных условиях культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / Т. П. Пирог [и др.] // *Микробиол. журн.* – 2016. – Т. 78, № 3. – С. 2–12.
9. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium / T. Pirog [et al.] // *Food Bioprod. Proces.* – 2013. – Vol. 91, N 2. – P. 149–157.
10. Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis* / F. S. Tareq [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2014. – Vol. 12, N 2. – P. 871–885.
11. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes / A. Abalos [et al.] // *Langmuir*. – 2001. – Vol. 17, N 5. – P. 1367–1371.
12. Mandal, S. M. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry / S. M. Mandal, A. E. Barbosa, O. L. Franco // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol. 31, N 5. – P. 338–345.
13. Подгорский, В. С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В. С. Подгорский, Г. О. Иутинская, Т. П. Пирог. – Киев : Наук. думка, 2010. – 327 с.
14. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / Т. П. Пирог [и др.] // *Микробиол. журн.* – 2013. – Т. 75, № 5. – С. 19–27.
15. Особенности метаболизма глюкозы и глицерола у *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – продуцента поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог [и др.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – Vol. 87, N 2. – P. 66–75.
16. Sakamoto, N. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties / N. Sakamoto, A. M. Kotre, M. A. Savageau // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 124, N 2. – P. 775–783.
17. Hudson, R. C. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1 / R. C. Hudson, L. D. Ruttersmith, R. M. Daniel // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1993. – Vol. 1202, N 2. – P. 244–250.
18. Lee, M. K. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs / M. K. Lee, J. M. González, F. T. Robb // *Extremophiles*. – 2002. – Vol. 6, N 2. – P. 151–159.
19. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications / M. W. Bhuiya [et al.] // *Extremophiles*. – 2000. – Vol. 4, N 6. – P. 333–341.
20. Sarada, K. V. Isolation and characterisation of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46 / K. V. Sarada, N. A. Rao, T. A. Venkatasubramanian // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1980. – Vol. 615, N 2. – P. 299–308.
21. Lin, H. P. Purification and characterization of NADP<sup>+</sup>-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* / H. P. P. Lin, H. C. Reeves // *Curr. Microbiol.* – 1991. – Vol. 22, N 6. – P. 371–376.
22. Choudhury, R. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli* / R. Choudhury, N. S. Puneekar // *Mycol. Res.* – 2009. – Vol. 113, N 10. – P. 1121–1126.

## References

1. Santos D. K., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 3. DOI: 10.3390/ijms17030401
2. Fair R. J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 6, pp. 25–64. DOI: 10.4137/PMC.S14459
3. Demain A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, vol. 41, no. 2, pp. 185–201. DOI: 10.1007/s10295-013-1325-z
4. Fracchia L., Banat J. J., Cavallo M., Ceresa C., Banat I. M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*, 2015, vol. 2, no. 3, pp. 144–162. DOI: 10.3934/bioeng.2015.3.144
5. Robbel L., Marahiel M. A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, no. 36, pp. 27501–27508. DOI: 10.1074/jbc.R110.128181. Epub. 2010
6. Pirog T. P., Konon A. D., Skochko A. B. Microbial surface active substances use in biology and medicine. *Biotechnologia* [Biotechnology], 2011, vol. 4, no. 2, pp. 24–38 (in Russian).
7. Pirog T. P., Panasyuk E. V., Nikityuk L. V., Iutynska G. O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia acta*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 38–47. DOI: 10.15407/biotech9.01.038
8. Pirog T. P., Savenko I. V., Shevchuk T. A., Krutous N. V., Iutynska G. O. Antimicrobial properties surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiologichny Zhurnal* [Microbiology Journal], 2016, vol. 78, no. 3, pp. 2–12 (in Russian).
9. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food and Bioprocess Processing*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 149–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001>.
10. Tareq F. S., Lee M. A., Lee H. S., Lee J. S., Lee Y. J., Shin H. J. Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis*. *Marine Drugs*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 871–885. DOI: 10.3390/md12020871
11. Abalos A., Pinazo A., Infante M. R., Casals M., Garcia F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 2001, vol. 17, no. 5, pp. 1367–1371.

12. Mandal S. M., Barbosa A. E., Franco O. L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, no. 5, pp. 338–345. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004
13. Podgorskiy V. S., Iutinskaya G. O., Pirog T. P. *Intensification of microbial synthesis technologies*. Kyiv, *Naykova Dumka* [Scientific Thought], 2010. 327 p. (in Russian).
14. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Mashchenko O. Yu., Parfenyuk S. A., Iutinskaya G. A. Effect of growth factors and some microelements on biosurfactant synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiologichny Zhurnal* [Microbiology Journal], 2013, vol. 75, no. 5, pp. 19–27 (in Russian).
15. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Beregova K. A., Kudrya N. V. Peculiarities of glucose and glycerol metabolism in *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2015, vol. 87, no. 2, pp. 66–75 (in Russian).
16. Sakamoto N., Kotre A. M., Savageau M. A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 124, no. 2, pp. 775–783.
17. Hudson R. C., Ruttersmith L. D., Daniel R. M. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1202, no. 2, pp. 244–250.
18. Lee M. K., González J. M., Robb F. T. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs. *Extremophiles*, 2002, vol. 6, no. 2, pp. 151–159.
19. Bhuiya M. W., Sakuraba H., Kujo C., Nunoura-Kominato N., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Ohshima T. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications. *Extremophiles*, 2000, vol. 4, no. 6, pp. 333–341.
20. Sarada K. V., Rao N. A., Venkatasubramanian T. A. Isolation and characterisation of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, vol. 615, no. 2, pp. 299–308.
21. Lin H. P. P., Reeves H. C. Purification and characterization of NADP<sup>+</sup>-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 1991, vol. 22, no. 6, pp. 371–376.
22. Choudhury R., Puneekar N. S. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli*. *Mycological Research*, 2009, vol. 113, no. 10, pp. 1121–1126. DOI: 10.1016/j.mycres.2009.07.009

### Информация об авторах

*Пирог Татьяна Павловна* – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua.

*Шевчук Татьяна Андреевна* – вед. инженер. Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины (ул. Академика Заболотного, 154, 03143, г. Киев, Украина).

*Савенко Инга Владимировна* – аспирант. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: inga92@ukr.net.

*Луцай Дарья Андреевна* – студент. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: lutayda0@ukr.net.

### Information about the authors

*Tatiana P. Pirog* – D. Sc. (Biol.), Leading researcher, Professor, Head of the Department. National University of Food Technologies (68, Vladimirskaya Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua.

*Tatiana A. Shevchuk* – Leading Engineer. Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine (154, Academician Zabolotny Str., 03143, Kiev, Ukraine).

*Inga V. Savenko* – Postgraduate student. National University of Food Technologies (68, Vladimirskaya Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: inga92@ukr.net.

*Dar'ya A. Lutsai* – Student. National University of Food Technologies (68, Vladimirskaya Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: lutayda0@ukr.net.