

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.С. Дугінець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ОКИСНЕННЯ ЕТАНОЛУ ПРОДУЦЕНТОМ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4

У клітинах штаму-продуцента поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, вирощеного на етанолі, визначено активність ключових ферментів C_2 -метаболізму.

Показано, що окиснення етанолу й ацетальдегіду у штаму K-4 здійснюється піролохінолінхінон(ПХХ)-і 4-нітрозо-N,N-діметиланілін(НДМА)-залежними дегідрогеназами. Активність НДМА-залежних ферментів була максимальною (100–300 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) у ранній експоненційній фазі росту *A. calcoaceticus* K-4. Наявність НДМА-залежних алкоголь- і ацетальдегіддегідрогеназ у грамнегативних бактерій встановлено вперше.

Ацетат залучається до метаболізму у штаму K-4 за участю як ацетаткінази, так і ацетил-КоА-синтетази; поповнення пулу C_2 -дикарбонових кислот здійснюється у гліоксилатному циклі (активність ізоцитратліази 600 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) і фосфоенолпіруваткарбоксилазній реакції (1600 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка). У синтезі вуглеводів беруть участь обидва ключові ферменти гліоконеогенезу: ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза (1200 і 4400 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка відповідно). Ензиматичні дослідження підтвердили здатність штаму K-4 до синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів (активність трегалозофосфатсинтази 150–160 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка).

К л ю ч о в і с л о в а: *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, етанол, C_2 -метаболізм, 4-нітрозо-N,N-діметиланілін-залежні дегідрогенази.

Штам *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує поверхнево-активні речовини (ПАР) за умов росту на гідрофільних (етанол) і гідрофобних (*n*-гексадекан) субстратах [2]. Слід зазначити, що нині у літературі практично відсутні дані щодо здатності мікроорганізмів синтезувати низькомолекулярні поверхнево-активні речовини у процесі культивування на етанолі. Враховуючи, що цей водорозчинний субстрат на порядок дешевший за «нетехнологічні» водонерозчинні гідрофобні сполуки, його використання для одержання ПАР може суттєво знизити вартість кінцевого продукту. Раніше нами було виділено штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, здатний синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями за умов росту на етанолі [9].

Нещодавно [31] у літературі з'явилося одне з перших повідомлень про здатність представників роду *Acinetobacter* синтезувати низькомолекулярні ПАР, що, правда, на основі гідрофобних субстратів. До недавнього часу у літературі була наявна інформація про синтез представниками роду *Acinetobacter* лише високомолекулярних біосурфактантів (комплекси позаклітинних полісахаридів і білків), яким притаманні емульгувальні, проте не поверхнево-активні властивості [15, 18, 20–22, 27, 29].

Наші попередні дослідження показали, що препарати ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі, є комплексом низькомолекулярних гліко- та аміноліпідів [2]. Визначено оптимальні умови культивування штаму K-4, що забезпечують максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин [2].

Одним із підходів до підвищення ефективності технологій мікробного синтезу є визначення особливостей метаболізму ростового субстрату. Виявлення можливих сайтів метаболічного лімітування і/або активаторів (інгібіторів) ключових ферментів метаболізму з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища дає змогу інтенсифікувати процес біосинтезу. Так, раніше нами було показано, що «вузьким» місцем метаболізму етанолу у *Acinetobacter* sp. В-7005 – продуцента мікробного полісахариду етаполану – є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою, швидкість-лімітувальна [5]. Встановлено умови культивування бактерій, що дають змогу усунути лімітування C_2 -метаболізму, підвищити у три рази активність ацетил-КоА-синтетази і реалізувати без зниження показни-

ків синтезу процес одержання етанолу на незабуференому середовищі, в якому вміст солей знижено у 4 рази (з 11 до 2,95 г/л) [5].

Зниження у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 – продуцента ПАР – концентрації катіонів калію (інгібіторів алкангидроксилази і НАДФ⁺-залежної альдегіддегідрогенази) до 1 мМ, підвищення до 35 мМ вмісту катіонів натрію (активаторів цих ферментів), внесення 36 мкмоль/л іонів заліза (II), необхідного для функціонування алкангидроксилази, супроводжувалося підвищенням активності ферментів метаболізму *n*-гексадекану, а також збільшенням у 4 рази кількості синтезованих ПАР [10].

Мета даної роботи – дослідження деяких особливостей метаболізму етанолу у *A. calcoaceticus* К-4 – продуцента поверхнево-активних речовин.

Матеріали і методи. Штам *A. calcoaceticus* К-4 депонований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером ІМВ В-7241.

A. calcoaceticus К-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): (NH₄)₂CO – 0,3; NaCl – 1,0; Na₂HPO₄ – 0,6; KH₂PO₄ – 0,14; MgSO₄×7H₂O – 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка [2]). Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 1 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з середини експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % етанолу. Кількість інокуляту – 5 % від об'єму середовища (10⁴–10⁵ клітин/мл). Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 24–72 год.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* К-4 на рідкому середовищі з етанолом, центрифугували (5000 г, 20 хв, 4 °С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М К⁺-фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 г, 15 хв 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М К⁺-фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграцт центрифугували (12000 г, 30 хв, 4°С), осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Активність алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1, КФ 1.1.1.2 і КФ 1.1.99.8), ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3, КФ 1.2.1.4, КФ 1.2.1.10), ацетаткінази (КФ 2.7.2.1), ацетил-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.1), ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) визначали як описано у роботі [8].

Активність нікотинопротеїнової (НАД(Ф)Н-вмісної) алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.99. –), альдегіддегідрогенази (КФ 1.2.99. –), ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.99.3) визначали як описано раніше [6].

Активність фосфоенліпуватсинтетази (ФЕП-синтетаза, КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксікінази (КФ 4.1.1.49), ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2), малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) визначали як описано у роботі [7], ФЕП-карбоксілази (КФ 4.1.1.31) – у роботі [3], трегалозофосфатсинтази (КФ 2.4.1.15) – у роботі [11].

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунок на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [13].

Активність ферментів аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* К-4.

Всі досліди проводили у трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від трьох до п'яти. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали як описано у роботі [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості $p < 0.05$.

Результати та їх обговорення. Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених синтезу представниками роду *Acinetobacter* високомолекулярних біосурфактантів на основі етанолу, що розпочалися з кінця 70-х років ХХ ст. [18, 20, 22] і продовжуються дотепер [15, 27, 29], у літературі є небагато інформації про особливості С₂-метаболізму цих бактерій. Так, наприклад, відомо, що окиснення етанолу у чотирьох штамів *A. calcoaceticus* здійснюється НАД⁺-залежною алкогольдегідрогеназою [14]; за умов росту *A. calcoaceticus* В4 на ацетаті індукується синтез ізоцитратліази [16]. НАДФ⁺-залежна алкогольдегідрогеназа *A. calcoaceticus* NCIB 8250 окиснює різні спирти, проте активність цього ферменту за використання як донора електронів етанолу була майже у 10 разів нижчою, ніж за присутності гексанолу [28]. Дослідження субстратної специфічності термостабільної НАДФ⁺-залежної алкогольдегідро-

генази *Acinetobacter* sp. M-1 показало, що найвища активність ферменту спостерігалась за використання як субстрату гептанолу, а у разі ацетальдегіду знижувалась майже у 20 разів [26]. У *Acinetobacter* sp. HO1-N функціонує дві НАД⁺-залежні алкогольдегідрогенази, одна з яких (етанолдегідрогеназа) необхідна для росту на коротколанцюгових, а інша (гексадеканодегідрогеназа) – на довголанцюгових спиртах [24]. Активність етанолдегідрогенази у клітинах штаму HO1-N, вирощеного на етанолі, становила 92,6 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. За використання як акцептора електронів НАДФ⁺ (замість НАД⁺) його активність знижувалася до 4,7 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка.

Результати досліджень метаболізму етанолу у продуцента полісахариду етаполану *Acinetobacter* sp. B-7005 [4, 5, 7, 8] є мало корисними для порівняльного аналізу особливостей C₂-метаболізму у різних представників роду *Acinetobacter*, оскільки аналіз 16S рРНК показав, що штам B-7005 не належить до роду *Acinetobacter*; а є найбільш близьким до бактерій родів *Rhodobacter* і *Paracoccus* [12]. Разом із тим розбіжності нуклеотидів у різних фрагментах гена 16S рРНК не дали змогу ідентифікувати штам B-7005 як представника роду *Rhodobacter* або *Paracoccus* [12].

Станом на початок грудня 2009 р. у Київській енциклопедії генів і геномів [32] наведено дані сиквенування геномів семи штамів, які належать до роду *Acinetobacter*: *Acinetobacter* sp. ADP1 (*A. baylyi*) і шести штамів виду *A. baumannii* (ACICU, AB0057, AB 307-0294, ATCC 17978, AYE, SDF). У цих штамів виявлено гени, що кодують синтез таких ключових ферментів C₂-метаболізму: НАД⁺-залежної алкоголь- і ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.1.1.1 і 1.2.1.3 відповідно), ізоцитратліази, ацетаткінази, ацетил-КоА-синтетази, малатсинтази, ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.32) і ФЕП-синтетази.

З врахуванням наведених даних, перший етап наших досліджень щодо можливих шляхів окиснення етанолу у *A. calcoaceticus* K-4 був присвячений виявленню у безклітинному екстракті бактерій активностей НАД⁺- і НАДФ⁺-залежних алкоголь- і альдегіддегідрогеназ. Проте активність цих ферментів була нестабільною і залежно від фізіологічного стану клітин коливалася від 0 до 15 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Дослідження активності НАД⁺- і НАДФ⁺-залежних дегідрогеназ в інтервалі рН від 7,0 до 9,5 показало, що оптимальним для всіх цих ферментів є значення рН 9,0, але й за такого рН їхня активність не перевищувала 20–25 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Отже, у *A. calcoaceticus* K-4, на відміну від описаних у літературі штамів роду *Acinetobacter*, НАД⁺ і НАДФ⁺-залежні алкоголь- і альдегіддегідрогенази не беруть участі в окисненні етанолу й ацетальдегіду.

У роботі [6] ми навели класифікацію алкогольдегідрогеназ мікроорганізмів. Крім НАД(Ф)⁺-залежних ферментів, окиснення етанолу може здійснюватися піролохінолінхінон(ПХХ)- і 4-нітрозо-*N,N*-діметиланілін- (НДМА)-залежними дегідрогеназами.

З літератури відомо, що у *A. calcoaceticus* TD 104 мембранна ПХХ-залежна алкогольдегідрогеназа функціонує при рості на алканах [17]. Наші дослідження показали, що виявлена за умов росту на етанолі *A. calcoaceticus* K-4 активність ПХХ-залежного ферменту (як і НАД(Ф)⁺-алкогольдегідрогеназ) була невисокою і становила близько 20 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка.

З огляду на це на наступному етапі досліджень у безклітинному екстракті штаму K-4 аналізували НДМА-залежну алкогольдегідрогеназну активність. НДМА-залежні ферменти – це нікотинопротейнові (НАД(Ф)Н-вмісні) алкогольдегідрогенази, в реакції виявлення яких 4-нітрозо-*N,N*-діметиланілін використовується як штучний акцептор електронів [23]. Такі ферменти містять як активний сайт зв'язаний НАД(Ф)Н, який є кофактором, проте не коферментом цих дегідрогеназ. Слід зазначити, що вперше НДМА-залежні алкогольдегідрогенази були виявлені у 90-х роках ХХ ст. у деяких грампозитивних бактерій (*Mycobacterium gastri*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *Rhodococcus* sp. і *Amycolatopsis methanolica*) [23]. Раніше [6] нами також було показано, що за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі в окисненні цього субстрату бере участь НДМА-залежний фермент. Разом із тим слід зазначити, що досі нікотинопротейнові алкогольдегідрогенази не були виявлені у жодного з представників грамнегативних бактерій за умов їхнього росту на етанолі. У літературі [30] є дані щодо наявності у формальдегідтолерантного штаму *Pseudomonas putida* F61 нікотинопротейнової формальдегіддисуптази, здатної здійснювати НДМА-залежне окиснення етанолу. Крім етанолу, цей фермент окиснює пропанол, бутанол, пентанол і гексанол.

Наступні наші дослідження показали, що за умов росту на етанолі у *A. calcoaceticus* K-4 функціонує НДМА-залежна алкогольдегідрогеназа: щоправда, активність цього ферменту перебувала на рівні 15–20 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Згідно з нашими власними експериментальними

даними [6] НДМА-залежна алкогольдегідрогеназна активність найвища у ранній експоненційній фазі росту бактерій. Аналіз активності ПХХ- і НДМА-залежних ферментів залежно від фізіологічного стану *A. calcoaceticus* К-4 показав, що вона також максимальна в ранній експоненційній фазі росту, і вже до середини цієї фази знижується на порядок (табл. 1). Це можна пояснити тим, що активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази у грампозитивних бактерій знижується у 2–20 разів за присутності аденілатів, ацетальдегіду і багато яких катіонів, що є інгібіторами даного ферменту і вміст яких у безклітинних екстрактах значний [6]. Разом із тим слід зазначити, що у ранній експоненційній фазі росту *A. calcoaceticus* К-4 активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази була досить високою і досягала 300 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка (див. табл. 1), що у кілька разів перевищує активність цього ферменту, виявлену у клітинах грампозитивних бактерій [6, 22]. Так, наприклад, за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази становила 155–158 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка [6].

Отже, окиснення етанолу у *A. calcoaceticus* К-4 здійснюється ПХХ- і НДМА-залежними алкогольдегідрогеназами – ферментами, не характерними для представників роду *Acinetobacter* і грамнегативних бактерій (останнє стосується НДМА-залежної дегідрогенази). Слід зазначити, що попередній аналіз 16S рРНК штаму *A. calcoaceticus* К-4 (неопубліковані дані) показав високий ступінь спорідненості цього штаму (рівень гомології 98–99 %) з бактеріями роду *Acinetobacter*.

Наступні дослідження показали, що за умов росту *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі ПХХ- і НДМА-залежні дегідрогенази, а також ацетальдегіддегідрогеназа ацилювальна здійснюють окиснення ацетальдегіду (табл. 2). Слід зазначити, що поодинокі повідомлення про нікотинопротейнові альдегіддегідрогенази мікроорганізмів з'явилися у літературі, починаючи з 2002 року, зокрема, про НДМА-залежну формальдегіддисмутазу *P. putida* F16 [30], формальдегіддегідрогеназу *P. putida* [25] і поліетиленглікольдегідрогеназу *Sphingomonas macrogoltabidus* 103 [19]. Останній фермент належить до нового типу НДМА-незалежних нікотинопротейнових альдегіддегідрогеназ, які не використовують НДМА як акцептор електронів. Детальніші дослідження показали, що формальдегіддегідрогеназа *P. putida* є насправді формальдегіддисмутазою. Отже, одержані нами результати є одними з перших повідомлень щодо функціонування у бактерій НДМА-залежної ацетальдегіддегідрогенази.

Таблиця 1

Залежність активності ПХХ- і НДМА-залежних алкогольдегідрогеназ від фаз росту *A. calcoaceticus* К-4

Фаза росту	Активність алкогольдегідрогенази (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)	
	ПХХ-залежної	НДМА-залежної
Рання експоненційна	222,3±8	298,2±13
Середина експоненційної	25,6±1,1	18,9±0,8
Кінець експоненційної – початок стаціонарної	20,2±1,0	16,5±0,7

Примітка. Тривалість вирощування штаму К-4 до настання ранньої експоненційної фази росту становила 24 год, середини експоненційної фази – 48 год, кінця експоненційної – початку стаціонарної фази – 72 год.

Таблиця 2

Активність ацетальдегіддегідрогеназ на різних фазах росту *A. calcoaceticus* К-4

Ацетальдегіддегідрогенази	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, що перебувають	
	на початку експоненційної фази росту	у кінці експоненційної фази
НДМА-залежна	97,7±4,5	5,5±0,2
ПХХ-залежна	172,4±6,8	338,2±15
Ацилювальна	33,5±1,5	61,6±3
НАД ⁺ -залежна (рН 9,0)	0	0
НАДФ ⁺ -залежна (рН 9,0)	0	0

Як видно з наведених у табл. 2 даних, активність НДМА-залежної ацетальдегіддегідрогенази *A. calcoaceticus* K-4, як і активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази (див. табл. 1) була максимальною у ранній експоненційній фазі росту. У той же час ПХХ-залежна ацетальдегіддегідрогеназна активність і активність ацилювального ферменту підвищувалася до кінця експоненційної фази майже у два рази (табл. 2). У безклітинному екстракті *A. calcoaceticus* K-4 не виявлено активності НАД⁻ і НАДФ⁺-залежних ацетальдегіддегідрогеназ.

Залучення ацетату до метаболізму у *A. calcoaceticus* K-4 здійснюється за участю ацетаткінази (115–125 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) і ацетил-КоА-синтетази (36–50 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка).

Активність деяких ферментів циклу трикарбонових кислот, анаплеротичних реакцій і біосинтетичних шляхів наведено у табл. 3. Як видно з наведених даних, за умов росту на етанолі у штаму K-4 функціонує неповний цикл трикарбонових кислот (відсутня активність 2-оксоглутаратдегідрогенази). Слід зазначити, що за даними секвенування геномів у всіх семи досліджених штамів роду *Acinetobacter* присутні гени, відповідальні за синтез цього ферменту [32]. Як анаплеротичні шляхи у *A. calcoaceticus* K-4 функціонує гліоксилатний цикл (активність ізоцитратліази упродовж експоненційної фази росту перебувала на рівні 580–600 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) і ФЕП-карбоксилазна реакція (активність ФЕП-карбоксилази 1600–1700 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка). Реакція карбоксилювання фосфоенолпірувату (як і карбоксилювання пірувату) є анаплеротичними у процесі вирощування мікроорганізмів на вуглеводних субстратах [3]. Раніше [7] нами було показано, що під час культивування на етанолі у клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005 – продуцента полісахариду етаполану – функціонує (окрім гліоксилатного циклу) і піруваткарбоксилазна реакція, а також у клітинах цих бактерій, вирощених на С₂-субстратах, виявлена активність й інших ферментів С₆-метаболізму. Такі несподівані результати ензимологічних досліджень стали основою для розробки технології одержання етаполану на змішаних С₂-С₆-субстратах [4]. Слід сподіватись, що подальше вивчення особливостей метаболізму *A. calcoaceticus* K-4 стане основою для розробки вискоєфективних технологій біосинтезу поверхнево-активних речовин на суміші ростових субстратів.

Таблиця 3

Активність деяких ферментів центрального метаболізму *A. calcoaceticus* K-4

Ферменти	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, що перебувають	
	на початку експоненційної фази росту	у кінці експоненційної фази
НАДФ ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	440±20	1100±45
Ізоцитратліаза	588±27	600±25
2-Оксоглутаратдегідрогеназа	0	0
НАД ⁻ -залежна малатдегідрогеназа	2200±95	292±11
ФЕП-карбоксилаза	1660±78	Н.в.
ФЕП-карбоксикіназа	1209±58	1094±40
ФЕП-синтетаза	4400±170	1406±55
Трегалозофосфатсинтаза	0	156±6

Примітка. «—» – Н.в. – не визначали.

За умов росту штаму K-4 на етанолі у синтезі вуглеводів, необхідних для конструктивного метаболізму, беруть участь обидва ключові ферменти глюконеогенезу – ФЕП-синтетаза і АТФ-залежна ФЕП-карбоксикіназа (табл. 3). За літературними даними [32] у бактерій роду *Acinetobacter* функціонує ГТФ-залежна ФЕП-карбоксикіназа. Зазначимо, що такі ферменти циклу трикарбонових кислот, як НАДФ⁺-залежна ізоцитратдегідрогеназа і НАД⁻-залежна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), виявлені у штаму K-4 (табл. 3), є характерними для представників роду *Acinetobacter* [32].

Раніше [2] нами було показано, що за умов росту на етанолі *A. calcoaceticus* K-4 синтезує комплекс поверхнево-активних речовин, до складу якого входять гліко- і аміноліпіди. Гліколіпіди, синтезовані штамом K-4, представлені трегалозомоно- і диміколатами. Слід зазначити, що здатність до синтезу трегалозоміколатів притаманна бактеріям роду *Rhodococcus* [6, 11, 21] і не характерна для представників роду *Acinetobacter*. Для підтвердження одержаних раніше даних щодо утворення трегалозоміколатів *A. calcoaceticus* K-4, аналізували актив-

ність трегалозофосфатсинтази – ключового ферменту синтезу цих сполук [11]. Дослідження показали, що трегалозофосфатсинтазна активність не виявляється у клітинах штаму К-4 з ранньої експоненційної фази росту, проте до кінця експоненційної фази досягає значення 150–160 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка (табл. 3). Зазначимо, що у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом активність трегалозофосфатсинтази на початку стаціонарної фази росту була у 2,5 рази нижчою порівняно з такою у *A. calcoaceticus* К-4 і становила 66 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка [11].

Отже, дослідження особливостей С₂-метаболізму *A. calcoaceticus* К-4 показало наявність у штаму ферментів, не характерних для представників роду *Acinetobacter*. До таких ферментів належать насамперед НДМА-залежні алкоголь- і ацетальдегіддегідрогенази, ПХХ-залежна ацетальдегіддегідрогеназа, АТФ-залежна ФЕП-карбоксикіназа і трегалозофосфатсинтаза. На відміну від описаних у літературі штамів роду *Acinetobacter*, у *A. calcoaceticus* К-4 функціонує неповний цикл трикарбонових кислот.

Одержані результати ензимологічних досліджень, зокрема, дані про наявність у штаму К-4 ферментів двох анаплеротичних шляхів (глюксилатного циклу і ФЕП-карбоксилазної реакції), можуть слугувати основою для розробки технології синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту цього штаму на суміші С₂-сполук і вуглеводних субстратів.

Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.С. Дугинец

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

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ЭТАНОЛА ПРОДУЦЕНТОМ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* К-4

Резюме

В клетках штамма-продуцента поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 определена активность ключевых ферментов С₂-метаболизма. Показано, что окисление этанола и ацетальдегида у штамма К-4 осуществляется пиролохинолинхинон (ПХХ)- и 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин(НДМА)-зависимыми дегидрогеназами. Активность НДМА-зависимых ферментов была максимальной (100–300 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) в ранней экспоненциальной фазе роста *A. calcoaceticus* К-4. Наличие НДМА-зависимых алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ у грамотрицательных бактерий установлено впервые. Ацетат вовлекается в метаболизм при участии как ацетаткиназы, так и ацетил-КоА-синтетазы; восполнение пула С₄-дикарбоновых кислот осуществляется в глюксилатном цикле (активность изоцитратлиазы 600 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и фосфоенолпируваткарбоксилазной реакции (1600 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка). В синтезе углеводов принимают участие оба ключевых фермента глюконогенеза: ФЕП-карбоксикіназа и ФЕП-синтетаза (1200 и 4400 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). Энзиматические исследования подтвердили способность штамма К-4 к синтезу поверхностно-активных трегалозомиколатов (активность трегалозофосфатсинтазы 150–160 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, этанол, С₂-метаболизм, 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин-зависимые дегидрогеназы.

T.P. Pirog, T.A. Shevchuk, O.S. Duginets

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

PECULIARITIES OF ETHANOL OXIDATION BY THE PRODUCER OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* К-4

Summary

Activity of key-enzymes of С₂-metabolism was determined in the cells of strain-producer of surface-active substances *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 grown on ethanol. It is shown that ethanol and acetaldehyde oxidation in the strain К-4 is performed by pyroquinolinquinon (PQQ) and 4-nitroso-*N,N*-dimethylaniline (NDMA)-dependent dehydrogenases. Activity of NDMA-dependent enzymes was maximum (100-300 nmol min⁻¹mg⁻¹ of protein) in the early exponential growth phase of *A. calcoaceticus* К-4. Availability of NDMA-dependent

alcohol and acetaldehyde dehydrogenases in gram-negative bacteria was established for the first time. Acetate is involved in metabolism in the strain K-4 with participation of both acetate kinase and acetate-KoA-synthetase; replenishment of the pool of C₄-dicarbonic acids is performed in glyoxylate cycle (activity of isocitrate lyase is 600 nmol min⁻¹mg⁻¹ of protein) and in phosphoenolpyruvate carboxylase reaction (1600 nmol min⁻¹mg⁻¹ of protein). Both key enzymes of gluconeogenesis take place in synthesis of carbohydrates: FEP-carboxykinase and FEP-synthetase (1200 and 4400 nmol min⁻¹mg⁻¹ of protein, respectively). Enzymatic investigations have confirmed the capacity of strain K-4 to synthesis of surface-active trehalosemycolates (activity of trehalosephosphate synthase is 150-160 nmol min⁻¹mg⁻¹ of protein).

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д с: *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, ethanol, C₂-metabolism, 4-nitroso-*N,N*-dimethyl aniline-dependent dehydrogenases.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Pirog T.P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny. St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Лакін Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. *Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А.* Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – **45**, № 3. – С. 304–310.
3. *Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В.* Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его C₆-метаболизма // Микробиология. – 2002. – **71**, № 2. – С. 215–221.
4. *Пирог Т.П., Корж Ю.В.* Этаполан – мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення // Біополімери і клітина. – 2006. – № 3. – С. 171–185.
5. *Пирог Т.П., Корж Ю.В.* Удосконалення біотехнології мікробного екзополісахариду етаполану на етанолі // Біотехнологія. – 2008. – **1**, № 3. – С. 47–55.
6. *Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А.* Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. – 2009. – **77**, № 6. – С. 749–757.
7. *Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.* Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // Микробиология. – 2003. – **72**, № 4. – С. 459–465.
8. *Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р.* Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Микробиология. – 2002. – **71**, № 2. – С. 222–229.
9. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И.* Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, № 5. – С. 544–550.
10. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.О.* Особливості окиснення алканів у *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхнево-активних речовин // Мікробіол. журнал. – 2009. – **71**, № 4. – С. 9–13.
11. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.О.* Деякі закономірності синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікробіол. журнал. 2010. – **72**, № 2. – С. 10–15.
12. *Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Малащенко Ю.Р.* Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Мікробіол. журн. – 2003. – **65**, № 5. – С. 46–65.
13. *Bradford M.* A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, N 3. – P.248–254.
14. *Beardmore-Gray M., Anthony C.* The absence of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* // J. Gen. Microbiol. – 1983. – **129**, N 10. – P. 2979–2983.
15. *Dams-Kozłowska H., Mercaldi M.P., Panilaitis B.J., Kaplan D.L.* Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its component // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **81**, N 2. – P. 201–210.
16. *Hoyt J.C., Johnson K.E., Reeves H.C.* Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase // J. Bacteriol. – 1991. – **173**, N 21. – P. 6844–6848.
17. *Jirausch M., Asperger O., Kleber H.P.* Alcohol oxidation by *Acinetobacter calcoaceticus* TD 104 – a n-alkane-utilizing and cytochrome P-450-producing strain // J. Basic Microbiol. – 1986. – **26**, N 6. – P. 351–357.

18. Kaplan N., Zosim Z., Rosenberg E. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – **53**, N 2.– P.440–446.
19. Ohta T., Tani A., Kimbara K., Kawai F. A novel nicotinoprotein aldehyde dehydrogenase involved in polyethylene glycol degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **68**, N 5.– P. 639–646.
20. Rosenberg E., Perry D., Gibson T., Gutnick D. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: spesificity of hydrocarbon substrate // Appl. Microbiol. – 1979. – **37**, N 2. – P.409–413.
21. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 2. – P. 154–162.
22. Rosenberg E., Rubinovitz C., Legmann R., Ron E. Z. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersan // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – **54**, N 2.– P.323–326.
23. Schenkels P., Duine J.A. Nicotinoprotein (NADH-containaing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of broad spectrum of alcohols and interconversion of alcohols and aldehydes // Microbiology. – 2000. – **146**, N 4.– P. 775–785.
24. Singer M.E., Finnerty W.R. Alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter* sp. Strain HO1-N: role in hexadecane and hexadecanol metabolism // J. Bacteriol. – 1985. – **164**, N 3. – P.1017–1024.
25. Tanaka N., Kusakabe Y., Ito K., Yoshimoto T., Nakamura K.T. Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenase // J. Mol. Biol. – 2002. – **324**, N 3. – P. 519–533.
26. Tani A., Sakai Y., Ishige T., Kato N. Thermostable NADP⁺-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – **66**, N 12. – P. 5231–5235.
27. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, N 3.– P.1102–1106.
28. Wales M. R., Fewson C.A. NADP-dependent alcohol dehydrogenase in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology. – 1994. – **140**, N 1. – P. 173–183.
29. Walzer G., Rozenberg E., Ron E.Z. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier // Environ. Microbiol. – 2006. – **8**, N 6. – P. 1026–1032.
30. Yanase H., Moriya K., Mukai N., Kawata Y., Okamoto K., Kato N. Effects of GroESL coexpression on the folding of nicotinoprotein formaldehyde dismutase from *Pseudomonas putida* F61 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2002. – **61**, N 1. – P. 85–91.
31. Zhao Z., Wong J.W.C. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene // Environ. Technol. – 2009. – **30**, N 3. – P. 291–299.
32. www.genome.jp/kegg/ KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database.

Отримано 21.09.2009