

Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Т.А. Шевчук

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина**ДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ ЭТАНОЛ
И АЦЕТАЛЬДЕГИД В *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ЭК-1**

В клетках штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, выращенного на этаноле, выявлено четыре типа алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназ: НАД⁺-, НАДФ⁺-, пиридоксалинхлорид (ПХХ)- и 4-нитрозо-*N,N*-диметиламин(НДМА)-зависимых ферментов. Активность НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимых алкогольдегидрогеназ, а также ПХХ- и НДМА-зависимых ацетальдегиддегидрогеназ была невысокой и составляла 3—11 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. Окисление этанола у данного штамма осуществляется НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназой, активность которой достигала максимального значения (до 155 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) в ранней экспоненциальной фазе роста. Ацетальдегид окисляется при участии НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимых дегидрогеназ с оптимумом pH 9,0—9,5.

Полученные результаты являются основой для разработки подходов к интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1.

К л ю ч е в ы е с л о в а: окисление, этанол, ацетальдегид, алкогольдегидрогеназа, ацетальдегиддегидрогеназа.

В предыдущих исследованиях было показано, что штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, выделенный нами из загрязненных нефтью образцов грунта, обладает способностью к образованию поверхностно-активных веществ (ПАВ) при росте на гидрофобных (*n*-гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах [1, 2]. Установлены условия культивирования штамма на среде с этанолом и *n*-гексадеканом (природа и концентрация источника азота, концентрация углеродного источника питания, длительность процесса, режимы массособмена и др.), позволяющие в три раза повысить количество образуемых ПАВ. Следует отметить, что в литературе имеются немногочисленные данные о способности бактерий рода *Rhodococcus* ассимилировать этанол в качестве источника углерода и энергии [9, 11], но нам не удалось обнаружить сведений о синтезе ПАВ при росте родококков на этом субстрате. Наши исследования показали, что по химической природе ПАВ, синтезируемые при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 на этаноле, представляют комплекс липидов с соединениями полисахаридно-белковой природы. В составе липидов выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодимиколаты) и нейтральные липиды (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты) [1].

Ранее было установлено, что показатели синтеза ПАВ при выращивании *R. erythropolis* ЭК-1 на *n*-гексадекане были существенно выше, чем на этаноле [1, 2].

Цель данной работы — изучение некоторых особенностей C₂-метаболизма у штамма *R. erythropolis* ЭК-1. Проведение таких исследований необходимо для выявления “узких” мест метаболизма этого субстрата и разработки подходов к их устранению, что позволит усовершенствовать технологию получения ПАВ на основе этанола.

Материалы и методы. Основным объектом исследований являлся штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, депонированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАНУ под номером ИМВ Ас-5017.

Культивирование *R. erythropolis* ЭК-1. Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава (г/л): Среда 1: KNO₃ — 1,5; NaCl — 1,0;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, pH 6,8—7,0. Среда 2: KH_2PO_4 — 6,8; NaOH — 1,0; NH_4NO_3 — 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, pH 6,8—7,0. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 2 % (по объему).

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °C в течение 48—168 ч.

В качестве посевного материала использовали суточную культуру, выращенную на мясо-пептонном (МПА) или глюкозо-картофельном (ГКА) агаре, а также культуру из экспоненциальной фазы роста (48—72 ч), выращенную на средах 1 и 2, содержащих 0,5 % этанола (по объему). В последнем случае концентрация инокулята составляла 5 % от объема засеваемой среды.

Определение показателей роста и синтеза ПАВ. Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес по калибровочному графику.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям:

1) поверхностное натяжение (σ) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью стеклянной пластинки [1, 2];

2) для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель условной концентрации ПАВ (ПАВ*), который определяли как степень разведения свободной от клеток культуральной жидкости (супернатанта) до точки ККМ (критическая концентрация мицеллообразования). Строили график зависимости поверхностного натяжения σ от значения логарифма разведения супернатанта [1, 2]. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению ПАВ*. Условная концентрация ПАВ выражается в безразмерных единицах;

3) индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости, который определяли как описано в работе [1]. В качестве гидрофобного субстрата для эмульгирования использовали подсолнечное масло.

Получение бесклеточных экстрактов. Бактериальную суспензию, полученную после культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °C). Полученный осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 4 раза по 60 с при 4 °C на аппарате УЗДН-1. Полученный дезинтегра́т центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость (бесклеточный экстракт) использовали в качестве источника ферментов.

Для получения бесклеточных экстрактов использовали клетки, находящиеся в ранней, середине и поздней экспоненциальной фазе роста (24, 48 и 72 ч культивирования соответственно).

Энзиматические анализы. Активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1 и 1.1.1.2) и ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3 и КФ 1.2.1.4) определяли спектрофотометрически по восстановлению NAD^+ или NADP^+ при 340 нм [4, 13] с использованием как донора электронов этанола и ацетальдегида соответственно.

Активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.8) и ацетальдегиддегидрогеназы определяли спектрофотометрически по восстановлению дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата (ФМС) при 600 нм [3] с этанолом и ацетальдегидом как донорами электронов.

Активность ацетальдегиддегидрогеназы ацилирующей (КФ 1.2.1.10) [7] анализировали по образованию ацетил-КоА, используя его реакцию с гидроксилами-

ном с образованием ацетилгидроксамата. Продукт реакции ацетилгидроксамата с хлорным железом определяли колориметрически при 540 нм.

Активность никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99. —) определяли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина (НДМА) при 440 нм с этанолом и метанолом как донорами электронов [18].

Активность ферментов определяли в нмоль полученного за 1 мин продукта реакции (НАДН или НАДФН для НАД⁺-зависимых и *N,N*-диметиламинофенилгидроксиламина для НДМА-зависимых дегидрогеназ) в пересчете на 1 мг белка. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Bradford [5].

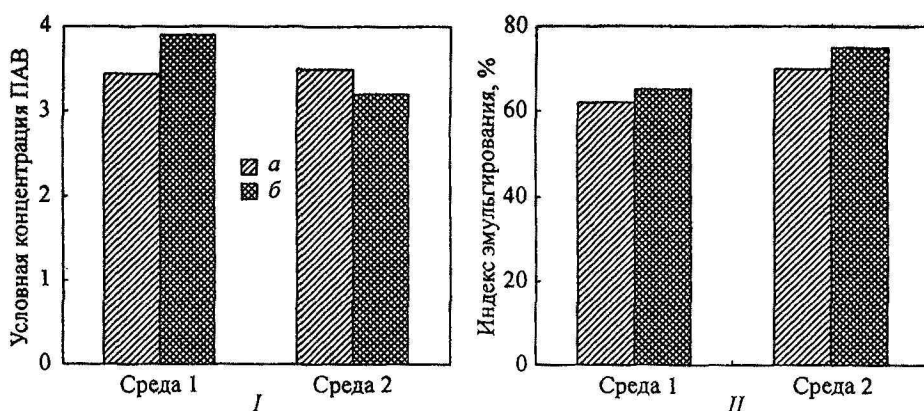
Активность ферментов определяли при 28—30 °С — температуре, оптимальной для роста штамма *R. erythropolis* ЭК-1.

Результаты и их обсуждение. Первым этапом метаболизма этанола у микроорганизмов является его окисление до ацетальдегида, осуществляемое алкогольдегидрогеназами. Алкогольдегидрогеназы используют различные акцепторы электронов и могут быть разделены на три группы [16, 17]. К первой группе относятся НАД(Ф)⁺-зависимые алкогольдегидрогеназы, которые на сегодняшний день являются наиболее изученными. Эта группа дегидрогеназ, использующих НАД(Ф)⁺ в качестве акцептора электронов, наиболее многочисленна. Представители второй группы — НАД(Ф)⁺-независимые алкогольдегидрогеназы, использующие как кофактор пироллохинолинхинон (ПХХ), гем (ассоциированный с ПХХ) или фактор F₄₂₀. В реакции выявления ПХХ-зависимой алкогольдегидрогеназы искусственным акцептором электронов является феназинметасульфат (ФМС) и 2,6-дихлорфенолиндифенол (ДФИФ), в связи с чем эти ферменты называются также ФМС- или ДФИФ-зависимыми. К третьей группе относятся флавиноадениндинуклеотид (ФАД⁺)-зависимые алкогольоксидазы, катализирующие необратимое окисление спиртов.

В 90-е годы XX ст. у некоторых грамположительных бактерий (*Mycobacterium gastri*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *Rhodococcus* sp. и *Amycolatopsis methanolica*) обнаружен новый тип никотинопротеиновых (НАД(Ф)Н-содержащих) алкогольдегидрогеназ, в реакции выявления которых в качестве искусственного акцептора электронов используется 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин (НДМА) [15, 20]. Такие ферменты называются НДМА-зависимыми алкогольдегидрогеназами. Они содержат в качестве активного сайта связанный НАД(Ф)Н, который является кофактором, но не коферментом этих дегидрогеназ.

Из литературы известно, что у бактерий рода *Rhodococcus*, растущих на этаноле, функционируют НАД(Ф)⁺- и НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы [18, 20]. Интересно отметить, что НДМА-зависимые ферменты родококков, выращенных на этаноле, способны окислять как этанол, так и метанол [18, 20]. В этих работах отмечается, что в окислении метанола и этанола принимают участие две различные НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы — метанол: 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин-оксидоредуктаза (МНО) и алкоголь: 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин-оксидоредуктаза (НДМА-АДГ). Так, при росте на среде с этанолом в клетках *R. erythropolis* DSM 1069 выявлена НАД⁺-алкогольдегидрогеназная активность с оптимумом pH 9,0, а также активность НДМА-АДГ и МНО [18].

В клетках *R. erythropolis* ЭК-1, выращенных на этаноле, выявлено четыре типа алкогольдегидрогеназ: НАД⁺-, НАДФ⁺-, ПХХ- и НДМА-зависимые ферменты. В табл. 1 указана активность ферментов в поздней экспоненциальной фазе роста бактерий. Обращает на себя внимание чрезвычайно низкий уровень активности всех исследуемых алкогольдегидрогеназ, который не может иметь существенного



Условная концентрация поверхностно-активных веществ (I) и индекс эмульгирования культуральной жидкости (II) при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на средах 1 и 2 в течение 72 ч (а) и 144 ч (б)

значения для метаболизма этанола ($4\text{--}10\text{ нмоль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка). В то же время при росте данных бактерий на этаноле уровень биомассы составлял $1,5\text{--}2,5\text{ г/л}$, условная концентрация ПАВ достигала значения $3,2\text{--}3,9$, индекс эмульгирования — $65\text{--}75\%$ (рисунок). Эти данные свидетельствуют об отсутствии лимитирования первых реакций метаболизма этанола у *R. erythropolis* ЭК-1.

Наши дальнейшие исследования были направлены на объяснение представленных выше неожиданных результатов: с одной стороны, бактерии достаточно хорошо растут на этаноле и синтезируют ПАВ (рисунок), а с другой — характеризуются низкой активностью ферментов, катализирующих первую реакцию окисления данного субстрата (табл. 1).

Из литературы известно, что активность НДМА-АДГ, определяемая в бесклеточном экстракте родококков, выращенных на этаноле, не превышает $4\text{--}6\text{ нмоль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка [18, 20], что согласуется с полученными нами данными. Одной из причин, объясняющих это явление, может быть то, что активность НДМА-АДГ снижается в $2\text{--}20$ раз в присутствии аденилатов, ацетальдегида и многих катионов, которые являются ингибиторами данного фермента [20]. Содержание таких ингибиторов в бесклеточных экстрактах достаточно высокое. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что после выделения и предварительной очистки данного фермента его активность возрастала на два порядка [20]. Учитывая это, в своих дальнейших экспериментах мы попытались более детально исследовать ПХХ-, НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимые алкогольдегидрогеназы, в частности, проверить зависимость активности этих ферментов от физиологического состояния клеток и значения pH реакционной смеси.

Таблица 1
Активность алкогольдегидрогеназ при росте *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на этаноле

Алкогольдегидрогеназы	Активность ($\text{нмоль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка) при росте на	
	среде 1	среде 2
НАД ⁺ -зависимая (pH 9,0)	$8,91\pm 0,04$	$9,41\pm 0,03$
НАДФ ⁺ -зависимая (pH 9,0)	$10,52\pm 0,05$	$8,57\pm 0,03$
ПХХ-зависимая	$7,23\pm 0,02$	$3,74\pm 0,01$
НДМА-зависимая	$4,92\pm 0,02$	$5,53\pm 0,02$

Примечание. Клетки из поздней экспоненциальной фазы роста.

Анализ активности алкогольдегидрогеназ в клетках бактерий из ранней (20—24 ч), середины (44—48 ч) и поздней (68—72 ч) экспоненциальной фазы роста показал, что ПХХ-, НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимая алкоголь-дегидрогеназная активность оставалась на уровне 4—10 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка независимо от физиологического состояния культуры. Исследование активности НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимых ферментов в интервале pH от 7,0 до 9,5 показало, что оптимальным является значение pH 9,0, при котором активность не превышала 10 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (табл. 1). Эти данные могут свидетельствовать о том, что окисление этанола у *R. erythropolis* ЭК-1, как и у других родококков, очевидно, осуществляется при участии НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы. Поскольку активность этого фермента ингибируется многими соединениями, содержащимися в бесклеточном экстракте [20], мы предположили, что его активность может оказаться максимальной в клетках, находящихся в самом начале экспоненциальной фазы роста (в экстрактах, полученных из таких клеток, содержание ингибиторов должно быть ниже, чем в экстрактах из более зрелых клеток). Для подтверждения этого предположения на следующем этапе мы анализировали активность НДМА-АДГ, а также активность МНО в клетках *R. erythropolis* ЭК-1 из ранней, середины и поздней экспоненциальной фазы роста (табл. 2).

Как видно из представленных в табл. 2 данных, при росте на этаноле в клетках *R. erythropolis* ЭК-1 выявлена как активность НДМА-АДГ, так и МНО, причем максимальная активность этих ферментов наблюдалась в ранней экспоненциальной фазе роста бактерий. Уже к середине экспоненциальной фазы активность данных алкогольдегидрогеназ существенно снижалась, а к концу экспоненциальной фазы составляла всего лишь 4—5 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. Таким образом, окисление этанола у *R. erythropolis* ЭК-1, как и у других родококков, катализируется НДМА-зависимыми алкогольдегидрогеназами.

Интересно отметить, что при культивировании штамма *R. erythropolis* ЭК-1 на среде 1 активность НДМА-АДГ и МНО в начале экспоненциальной фазы роста была почти в два раза ниже, чем на среде 2 (84—85 и 146—156 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно). В то же время на среде 1 активность этих ферментов снижалась к середине экспоненциальной фазы роста всего лишь в два раза (до 40—50 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка), а на среде 2 — более, чем в 7 раз (до 11—22 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).

Ацетальдегид, образующийся в процессе окисления этанола, вовлекается в метаболизм при участии ацетальдегиддегидрогеназ. В зависимости от использования того или иного акцептора электронов в дегидрогеназной реакции, различают несколько типов ацетальдегиддегидрогеназ. У большинства микроорганизмов

Т а б л и ц а 2

Влияние физиологического состояния клеток *R. erythropolis* ЭК-1, выращенных на этаноле, на активность НДМА-зависимых алкогольдегидрогеназ

Среда культивирования	Фаза роста бактерий	Активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка)	
		НДМА	МНО
1	ранняя экспоненциальная	85,32±0,39	83,73±0,40
	середина экспоненциальной	51,45±0,25	40,16±0,21
	поздняя экспоненциальная	4,91±0,02	5,08±0,02
2	ранняя экспоненциальная	155,92±0,69	145,89±0,73
	середина экспоненциальной	21,83±0,11	10,93±0,05
	поздняя экспоненциальная	5,54±0,02	4,34±0,02

П р и м е ч а н и е. Состав сред указан в разделе «Материалы и методы».

функционируют НАД(Ф)⁺-зависимые ферменты [6, 8, 19]. В последнее время появились сообщения об окислении ацетальдегида у бактерий ПХХ- и НДМА-зависимыми ацетальдегиддегидрогеназами [12, 18].

В бесклеточном экстракте *R. erythropolis* ЭК-1 выявлено несколько ацетальдегиддегидрогеназ (табл. 3). Активность ПХХ- и НДМА-зависимых ферментов не превышала 7—7,5 нмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка. Из данных, представленных в табл. 3, следует, что окисление ацетальдегида у штамма *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляется НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимыми ацетальдегиддегидрогеназами. Исследование влияния pH реакционной смеси на активность этих ферментов показало, что оптимум pH для НАД⁺-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы составляет 9,5 (активность 95—110 нмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка), для НАДФ⁺-зависимого фермента — 9,0—9,5 (активность 26—45 нмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка). В бесклеточном экстракте *R. erythropolis* ЭК-1 нам не удалось обнаружить активность ацетальдегиддегидрогеназы ацилирующей.

Из литературы известно, что у *R. erythropolis* UPV-1, растущего на этаноле, функционирует НАД⁺-зависимая ацетальдегиддегидрогеназа, которая способна окислять также формальдегид [14]. В работе [14] отмечается, что благодаря этому свойству штамм *R. erythropolis* UPV-1 может быть использован для удаления формальдегида из промышленных сточных вод. Следует отметить, что представители рода *Rhodococcus*, в частности, штаммы *R. erythropolis* характеризуются наличием широкого набора различных ферментов, в том числе и дегидрогеназ, что позволяет рассматривать и сами штаммы родококков, и их ферменты как перспективные для использования в различных природоохранных биотехнологиях [10].

В результате проведенной нами работы установлено, что в клетках *R. erythropolis* ЭК-1 функционируют четыре типа алкоголь- и четыре типа ацетальдегиддегидрогеназ. При культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 на этанолсодержащих средах окисление этого субстрата осуществляется 4-нитрозо-

Таблица 3

Активность ацетальдегиддегидрогеназ при росте
Rhodococcus erythropolis ЭК-1 на этаноле

Ацетальдегиддегидрогеназа	pH реакционной смеси	Активность (нмоль · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка) при росте на	
		среде 1	среде 2
НАД ⁺ -зависимая	7,0	12,63±0,06	4,91±0,02
	7,5	15,95±0,07	17,73±0,08
	8,0	23,55±0,08	18,45±0,09
	8,5	35,54±0,17	30,71±0,15
	9,0	35,01±0,17	35,70±0,16
	9,5	96,72±0,48	110,55±0,55
НАДФ ⁺ -зависимая	7,0	9,29±0,04	8,52±0,03
	7,5	10,33±0,05	9,71±0,04
	8,0	17,57±0,08	12,06±0,06
	8,5	25,63±0,12	19,17±0,09
	9,0	40,35±0,22	26,46±0,13
	9,5	44,82±0,24	29,71±0,11
ПХХ-зависимая		7,22±0,03	3,15±0,01
НДМА-зависимая		7,34±0,02	4,38±0,02
Ацилирующая		0	0

Примечание. Клетки из середины экспоненциальной фазы роста.

N,N-диметиланилін-зависимой алкогольдегидрогеназой, активность которой максимальна в ранней экспоненциальной фазе роста, а акцепторами электронов в ацетальдегиддегидрогеназной реакции являются НАД⁺ и НАДФ⁺. Полученные результаты являются основой как для разработки подходов к интенсификации биосинтеза ПАВ, так и для исследования потенциального использования данного штамма в процессах биоконверсии и деградации различных ксенобиотиков.

Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Т.А. Шевчук

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

ДЕГІДРОГЕНАЗИ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ В ОКИСНЕННІ ЕТАНОЛУ І АЦЕТАЛЬДЕГІДУ У *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* EK-1

Резюме

У клітинах штаму *Rhodococcus erythropolis* EK-1, вирощеного на етанолі, виявлено чотири типи алкоголь- і ацетальдегиддегидрогеназ: НАД⁺-, НАДФ⁺-, піролохінолінхінон (ПХХ)- і 4-нітрозо-*N,N*-диметиланілін (НДМА)-залежних ферментів. Активність НАД⁺- і НАДФ⁺-залежних алкогольдегидрогеназ, а також ПХХ- і НДМА-залежних ацетальдегиддегидрогеназ була невисокою і становила 3—11 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Окиснення етанолу у цього штаму здійснюється НДМА-залежною алкогольдегидрогеназою, активність якої досягала максимального значення (до 155 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) у ранній експоненційній фазі росту. Ацетальдегид окиснюється за участю НАД⁺- і НАДФ⁺-залежних дегидрогеназ з оптимумом pH 9,0—9,5.

Отримані результати є основою для розробки підходів до інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* EK-1.

Ключові слова: окиснення, етанол, ацетальдегид, алкогольдегидрогеназа, ацетальдегиддегидрогеназа.

T.P. Pirog, Yu.V. Korzh, T.A. Shevchuk

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

DEHYDROGENASES OXIDIZING ETHANOL AND ACETALDEHYDE IN *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* EK-1

Summary

Four types of alcohol- and acetaldehyde dehydrogenases were found in the cells of strain *Rhodococcus erythropolis* EK1 grown on ethanol. They are as follows: NAD-, NADP-, pyroquinoline quinone (PQQ)- and 4-nitroso-*N,N*-dimethyl aniline (NDMA)-dependent enzymes. Activity of NAD- and NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenases, as well as PQQ and NDMA-dependent acetaldehyde dehydrogenases was low and made up 3-11 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ of protein.

Ethanol oxidation in the given strain is realized by NDMA-dependent alcohol dehydrogenase, which activity reached its maximum value (up to 15 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ of protein) in the early exponential growth phase. Acetaldehyde is oxidized with participation of NAD and NADP-dependent dehydrogenases with optimum pH 9.0—9.5.

The results obtained are a basis for development of approaches to intensification of surfactants synthesis by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 strain.

The paper is presented in Russian.

Key words: oxidation, ethanol, acetaldehyde, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase.

The author's address: T.P. Pirog, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad, Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *R. erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 544—550.
2. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. — 2005. — № 6. — С. 27—36.
3. Anthony C., Zatman L.J. The microbial oxidation of methanol. Purification and properties of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27 // Biochem. J. — 1967. — 104. — P. 953—955.
4. Beardmore-Gray M., Anthony C. The absence of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* // J. Gen. Microbiol. — 1983. — 129, N 10. — P. 2979—2983.
5. 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. — P. 248—254.
6. Bruchhaus I., Tannich E. Purification and molecular characterization of the NAD⁺-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica* // J. Biochem. — 1994. — 303, № 3. — P. 743—748.
7. Burton R.H., Stadtman E.R. The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A // J. Biol. Chem. — 1953. — 202, N 2. — P. 873—890.
8. Cobessi D., Tete-Favier F., Marchal S., Azza S., Branlant G., Aubry A. Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans* // J. Mol. Biol. — 1999. — 290, № 1. — P. 161—173.
9. de Carvalho C., Parreno-Marchante B., Neumann G. et al. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — 67. — P. 383—388.
10. de Carvalho C., da Fonseca M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — 67. — P. 715—726.
11. de Carvalho C., da Fonseca M. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. — 2005. — 51. — P. 388—399.
12. Dailly Y., Mat-Jan F., Clark D.P. Novel alcohol dehydrogenase activity in a mutant of *Salmonella* able to use ethanol as carbon source // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — 201, № 1. — P. 41—45.
13. Hommel R., Kurth J., Kleber H.P. NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rancens* CCM 1774: purification and properties // J. Basic Microbiol. — 1988. — 28, N 1—2. — P. 25—33.
14. Jaureguibeitia A., Saa M., Llama M.J., Serra J.L. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — 73. — P. 1073—1086.
15. Nagy I., Verheijen S., De Schrijver A. et al. Characterization of the *Rhodococcus* sp. N186/21 gene encoding alcohol:N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase inducible by atrazine and thiocarbamate herbicides // Arch. Microbiol. — 1995. — 163, № 6. — P. 439—446.
16. Peng X., Taki H., Komukai S. et al. Characterization of four *Rhodococcus* alcohol dehydrogenase genes responsible for the oxidation of aromatic alcohols // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — 71. — P. 824—832.
17. Reid M.F., Fewson C.A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases // Crit. Rev. Microbiol. — 1994. — 20. — P. 13—56.
18. Schenkels P., Duine J.A. Nicotinoprotein (NADH-containing) 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. — P. 775—785.
19. Schobert M., Görsch H. Cytochrome c₅₅₀ is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and sequencing of the genes encoding cytochrome c₅₅₀ and an adjacent acetaldehyde dehydrogenase // Microbiology. — 1999. — 145, № 2. — P. 471—481.
20. 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. — P. 819—826.

Отримано 29.05.2007