

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

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

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

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

Исследовано влияние одновалентных катионов на активность ключевых ферментов  $C_2$ -метаболизма у продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, выращенного на этаноле.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л):  $KNO_3$  – 1,0,  $NaCl$  – 1,0,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  – 0,6,  $KH_2PO_4$  – 0,14,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,1, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8–7,0 (среда 1), а также на среде 2, аналогичной по составу среде 1, за исключением  $KNO_3$ . Вместо  $KNO_3$  в среде 2 использовали  $(NH_4)_2CO$  в эквимолярной по азоту концентрации. В одном из вариантов в среду 2 дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему [11]). В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1–2 % (по объему). Посевной материал – культура из середины экспоненциальной фазы роста (48 ч), выращенная на средах указанного выше состава с 0,5 % этанола. Количество инокулята – 5 % от объема засеваемой среды ( $10^4$ – $10^5$  клеток/мл). Культивирование осуществляли в 750 мл колбах со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °C в течение 24–120 ч.

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

Для получения бесклеточных экстрактов бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °C). 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) 3 раза по 40 с при 4 °C на аппарате УЗДН-1 (Россия). Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Резюме**

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

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

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

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

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

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

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

**Summary**

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

The paper is presented in Russian.

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

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

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Дугинец О.С. Особенности окисления этанола у продуцента поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Микробиол. журн. – 2010. – **72**, № 6. – С. 3–10.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долошенко Е.Ю. Роль фосфоенолпируваткарбоксилазы в синтезе поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Микробиол. журн. – 2011. – **73**, № 3. С. 9–15.
3. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – Киев: Наук. думка, 2010. – 327 с.
4. Akinterinwa O., Khankal R. Cirino P. C. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols // Cur. Opinion Biotechnol. – 2008. – **19**, N 5 – P. 461–467.
5. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**, N 5. – P. 2608–2615.
6. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, № 3. – P.248–254.
7. Klein-Marcuschamer, Ajikumar P.K., Stephanopoulos G. Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene // Trends Biotechnol. – 2007. – **25**, N 9. – P. 417–424.
8. Mukhopadhyay A., Redding A. M., Rutherford B. J., Keasling J. D. Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production // Cur. Opinion Biotechnol. – 2008. – **19**, N 3. – P. 228–234.
9. Park J. H., Lee S.Y. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production //Ibid. – 2008. – **19**, N 5. – P. 454–460.
10. Pirog T.P., Korzh Yu.V., Shevchuk T.A., Tarasenko D.O. Peculiarities of C<sub>2</sub>-metabolism and intensification of the synthesis of surface active substances in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 grown in ethanol // Microbiology. – 2008. – **77**, N 6. – P. 665–673.
11. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. – 2009. – **45**, N 3. – P. 272–278.
12. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – **46**, N 6. – P. 599–606.
13. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 2. – P. 154–162.
14. Ruffing A., Chen R.R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis // Microbial Cell Factories. – 2006. – **5**. – P. 25–33.
15. Stack D., Neville C., Doyle S. Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi // Microbiology. – 2007. – **153**, N 5. – P. 1297–1306.
16. Van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J. A. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // Eur. J. Biochem. – 1993. – **212**, N 3. – P. 819–826.

Отримано 10.06.2012