

## VYUŽITIE OCTOVÝCH BAKTÉRIÍ V BIOTECHNOLOGICKOM PRIEMYSLE PRI PRODUKCII ORGANICKÝCH KYSELÍN

VLADIMÍRA BILSKÁ

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, E-mail: bilaska@fns.uniba.sk

Došlo dňa 20.I.1997

### Obsah

1. Úvod
2. Produkcia organických kyselín octovými baktériami
3. Fermentácia kyseliny octovej u baktérii rodu *Acetobacter*
4. Produkcia glukónových a ketoglukónových kyselín
5. Produkcia kyseliny propiónovej u octových baktérií

### 1. Úvod

V súčasných biotechnologických procesoch majú široké uplatnenie okrem buniek *Escherichia coli* aj ďalšie bakteriálne druhy rodov *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, *Streptomyces* a v neposlednom rade aj zástupcovia octových baktérií. Skupinu octových baktérií tvoria tri základné bakteriálne rody, ktorých metabolizmus je striktno aeróbnym *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Frateuria*<sup>1-4</sup>. Zdrojmi uhlíka octových baktérií môžu byť etanol, glukóza, laktát a acetylát, ktoré sú oxidované na oxid uhličitý a vodu. Väčšina kmeňov využíva ako zdroj uhlíka aj glycerol, naproti tomu manitol a glutamát sú využívané zriedkavo. Laktózu, dexetrán a škrob nehydrolyzujú. Ich veľkou výhodou sú nenáročné kultivačné podmienky a hlavne rast pri nízkom pH prostredia (pod pH 5,5), čo pre iné bakteriálne druhy je absolútne nevyhovujúce.

Mnohé kmene octových baktérií majú široké uplatnenie v potravinárskom a biotechnologickom priemysle pri produkcii významných organických kyselín - popri kyseline octovej je to kyselina glukónová, glukurónová a propiónová. Octové baktérie sú popísané ako producenti biotechnologicky významných látok, z ktorých najvýznamnejšia je

celulóza a rôznych exopolysacharidov napr. acetánu (druh *Acetobacter xylinum*). Naproti tomu premena D-sorbitolu na L-sorbózu pri syntéze vitamínu C je zase významnou vlastnosťou baktérií rodu *Gluconobacter*.

V posledných rokoch sa stali octové baktérie významným objektom štúdia molekulárnej biológie so snahou zužitkovať produkty bunky ako restriktčné endonukleázy, kryptické plazmidy a enzýmy metabolizmu sacharidov pre priemyselné aplikácie a ukázať, že aj bunka octovej baktérie podobne ako *E. coli* môže zaujať dôstojné miesto v modernej biotechnológii. Mnohé druhy rodu *Acetobacter* produkujú dôležité enzýmy metabolizmu nukleových kyselín, najmä restriktčné endonukleázy a metyltransferázy, ktoré sú nevyhnutným nástrojom pri tvorbe rekombinantných molekúl DNA. Medzi významné restriktčné endonukleázy izolované z buniek *Acetobacter pasteurianus* patria ApaI<sup>5</sup> s rozpoznávacou a štiepiacou palindromickou sekvenciou 5'-GGGCC<sup>↓</sup>C-3', pričom po štiepení zanecháva 3'-prečnievajúce konce, ApaLI<sup>6</sup> štiepi v mieste nukleotidovej sekvencie 5'-G<sup>↓</sup>TGCAC-3' a ApaBI<sup>7,8</sup> so štiepiacou palindromickou sekvenciou 5'-GCTNNNNN<sup>↓</sup>AGC-3'. V bunkách *Acetobacter pasteurianus* boli popísané aj ďalšie restriktčné endonukleázy, ktoré sú prevažne iba izoschizomérméne enzýmy so známymi a skôr izolovanými enzýmami z iných baktérií napr. AaaI<sup>9</sup>, ApaCI<sup>10,11</sup>.

Bunky octových baktérií sú zdrojom širokého spektra kryptických plazmidov s rznou molekulovou veľkosťou v rozmedzí od 0,9 do 17 megadaltonov a významnými replikónmi<sup>12-19</sup>. Hoci vzťah prítomnosti a funkcie niekoľkých plazmidov v jednej bunke baktérie je nejasný, mnohé z nich sa využili na konštrukciu klonovacích, spočiatku dvojreplikónových vektorov, napr. plazmidy pTA5001A a pTA5001B izolované z kmeňa *A. aceti* No 1023 (cit. <sup>20</sup>), plazmid pAH4 (cit. <sup>21</sup>), pAP12855 (cit. <sup>22</sup>) a neskor originálnych vektorov s jedným širokospektrálnym multi-kópiovým replikónom ako je replikón AC1 (cit. <sup>21-26</sup>) z plazmidu pAC1 (cit. <sup>19</sup>) z *Acetobacter pasteurianus*, ktoré umožňujú identifikovať gény pre dôležité metabolické dráhy octových baktérií.

Ďalším významným aspektom je využitie octových baktérií ako hostiteľských organizmov na produkciu významných peptidov a proteínov, z ktorých významná je

$\beta$ -galaktozidáza exprimovaná v bunkách *Acetobacter*<sup>27</sup>. Expresia virálnych bielkovín v hostiteľskom mikroorganizme *Acetobacter methanolicus* ukázala nové možnosti, pretože kultivácia v tkanivových bunkových kultúrach je príliš náročná.

## 2. Produkcia organických kyselín octovými baktériami

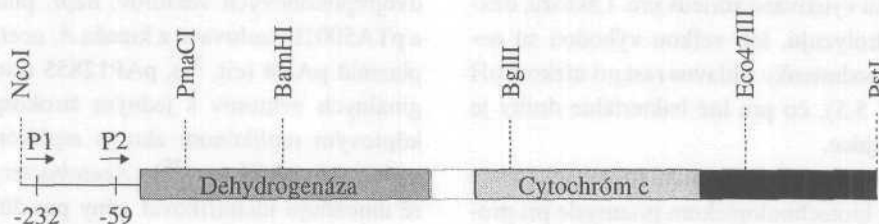
Z mikrobiologického taxonomického hradiska octové baktérie sú predovšetkým charakterizované ako druhy schopné oxidovať etanol a produkovať kyselinu octovú. Nemenej dôležité sú metabolické pochody, pri ktorých octové baktérie využívajú aj iný uhlíkatý zdroj ako etanol, napr. glukózu, ktorú premieňajú za vzniku organických kyselín, napr. kyseliny glukónovej, kyseliny ketoglukónovej a ďalších.

## 3. Fermentácia kyseliny octovej u baktérií rodu *Acetobacter*

Produkcia kyseliny octovej je nepochybne jedna z najdôležitejších a aj najdlhšie využívaných schopností baktérií rodu *Acetobacter*. Pri metabolizme etanolu vzniká za prítomnosti dvoch enzýmov octového kvasenia viazaných na bunkovú membránu alkoholdehydrogenázou (ADH) a aldehyddehydrogenázou (ALDH) kyselina octová. V bunkách je zároveň prítomný aj mechanizmus zabezpečujúci rezistenciu voči etanolu a kyseline octovej<sup>28</sup>. Enzým ADH bol študovaný u druhov *A. aceti*, *A. pasteurianus* a *A. polyoxogenes*. Tvorí komplex proteínových podjednotiek - katalytickej a cytochrómu c, pričom u niektorých bakteriálnych druhov enzým obsahuje navyše aj 15 kDa podjednotku, ktorá stabilizuje 78 kDa podjednotku<sup>29,30</sup>. Gény pre príslušné podjednotky sú organizované ako jeden operón.

Podobná štruktúra operónu bola potvrdená aj u metylotropnej baktérie *A. methanolicus*, kde operón tvoria gény kódujúce metanol-dehydrogenázu a cytochróm c (cit. <sup>31</sup>). Regulácia a expresia génov v operóne závisí od vonkajších kultivačných podmienok baktérie. Známa je indukcia ADH etanolom v bunkách *A. pasteurianus* NCI1380 (cit. <sup>32</sup>). Ak sú bunky kultivované v prítomnosti etanolu, aktivita ADH sa zvýši asi desaťnásobne, pričom počet podjednotiek enzýmu na bunku je rovnaký ako u etanolom neindukovaných buniek. Sledovaním lokalizácie enzýmu sa dokázalo, že väčšina podjednotiek ADH je v tomto prípade lokalizovaná v membránovej frakcii buniek. Ak sa koncentrácia etanolu v prostredí zníži alebo ak sa v prostredí nenachádza, podstatná časť podjednotiek enzýmu je lokalizovaná v cytoplazme<sup>32</sup>. Vysvetlením tohto javu je prítomnosť dvoch rozdielnych promótorov v ADH operóne (obr. 1), ktoré zabezpečujú syntézu enzýmov s odlišnou afinitou k bunkovej membráne či cytoplazme v závislosti od prítomnosti etanolu<sup>33</sup>. Jeden z transkripčných promótorov je v polohe -59 bp od počiatku replikácie (*ori*) a transkripcia z neho sa uskutečňuje v prítomnosti etanolu. Druhý promótor je podstatne vzdialenejší od počiatku transkripcie a nachádza v polohe -232 bp od *ori* a využíva sa v prípade, ak etanol v médiu nie je prítomný. Regulačný vzťah medzi prepínaním promótorov a syntézou enzýmov s rôznou afinitou k cytoplazme a k membráne nie je doposiaľ jasný. Fenomén vplyvu podmienok vonkajšieho prostredia bol pozorovaný pri *A. aceti* a *Gluconobacter suboxydans*. Pri dobrých aeračných podmienkach bola ADH inaktívna, kým pri zníženom množstve kyslíka vzrástla asi desaťkrát<sup>34</sup>. Aktívny enzým sa od neaktívneho nelíši ani v zložení obsahu podjednotiek, molekulevej veľkosti či v obsahu prostetických skupín. Inaktívna ADH má čiastočne pozmenenú konformáciu a je čiastočne oxidovaná, kým aktívna ADH je charakterizovaná základnou konformačnou štruktúrou a je v redukovanom stave.

Aldehyddehydrogenáza (ALDH) je tvorená dvoma



Obr. 1. Organizácia a restričná mapa ADH operónu *Acetobacter pasteurianus* NCI1380. PstI-BamHI fragment kóduje podjednotku cytochróm c a COOH terminálny koniec 75 kDa dehydrogenázovej podjednotky. NcoI-BglII fragment kóduje 75 kDa podjednotku s dehydrogenázovou aktivitou

podjednotkami a nevykazuje žiadnu štruktúrnu homológiu s enzýmom ADH<sup>35</sup>. Dôležitými faktormi fermentačnej aktivity octových baktérií sú rezistencia voči kyseline octovej a etanolu. Rezistencia voči kyseline octovej je u *A. aceti* No. 1023 (cit. <sup>36</sup>) determinovaná okrem iného génmi *aarA*, *aarB* a *aarC*, ktoré sú usporiadané v 8,3 kb operóne. Gén *aarA* má vysokú homológiu s génom pre citrát-syntetázu u *E. coli* a iných baktérií<sup>37,39</sup> a *aarC* gén je homologický s génom *acu-8*, ktorý je zahrnutý v utilizácii acetátu u vláknitej huby *Neurospora crassa*<sup>40</sup>. Jedným z mechanizmov je pravdepodobne detoxikácia účinnou asimiláciou kyseliny octovej inkorporovanej v bunkách. Rezistencia buniek voči etanolu je zabezpečená zvýšením aktivity alkoholdehydrogenázy tak, že etanol podporuje integráciu ADH do bunkovej membrány a tým mnohonásobne zvyšuje utilizáciu etanolu.

#### 4. Produkcia glukónových a ketoglukónových kyselín

Mnohé druhy octových baktérií, predovšetkým rodu *Gluconobacter* sú schopné oxidovať glukózu za vzniku organických kyselín ako je kyselina glukónová, kyselina 2-ketoglukónová, kyselina 5-ketoglukónová a kyselina 2,5-diketoglukónová<sup>41</sup>. Dehydrogenáciou glukózy za prítomnosti enzýmu glukózodehydrogenáza vzniká kyselina glukónová, ktorej kofaktorom je pyroloquinolín quinón<sup>42</sup>. Takmer všetky druhy rodu *Gluconobacter* ju následne oxidujú na kyseliny ketoglukónové. Tieto dehydrogenačné reakcie katalyzujú príslušné dehydrogenázy jednotlivých kyselín. Pomer tvorby 2-ketoglukonátu, 5-ketoglukonátu alebo 2,5-diketoglukonátu závisí predovšetkým od vlastností bakteriálneho kmeňa a od kultivačných podmienok<sup>43,44</sup>. Štúdium tvorby ketoglukonátov u väčšiny kmeňov octových baktérií ukázalo, že kyselina 2-ketoglukónová a kyselina 5-ketoglukónová sa produkujú v rovnakom pomere, ale iba niektoré kmene sú schopné tvoriť diketoglukonát<sup>43,45</sup>. Štruktúra operónov zodpovedných za túto metabolickú cestu a spôsoby regulácie nie sú doteraz známe.

#### 5. Produkcia kyseliny propiónovej u octových baktérií

Na priemyselnú produkciu kyseliny propiónovej sa donedávna využíval najmä druh *Propionibacterium spp.* Sub-

strátni pre anaeróbný vznik kyseliny propiónovej boli vo vode rozpustné uhľovodíky ako aj glukóza. Výťažok celkových kyselín pri fermentácii cukru je obvykle 50-75 % (w/w). Veľkou nevýhodou je aj pomalý rast tejto baktérie (7-14 hodín) a malá efektívnosť produkcie propionátu (20-30 g.l<sup>-1</sup>). Keďže octové baktérie sú schopné fermentovať aj propanol za vzniku kyseliny propiónovej a ich kultivácia je nenáročná, začínajú sa využívať v biotechnologickom priemysle ako producenti tejto organickej kyseliny<sup>1,2,46</sup>. Tvorba kyseliny propiónovej v bakteriálnom druhu *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 je katalyzovaná enzýmami, ktoré sa zúčastňujú produkcie kyseliny octovej a to alkoholdehydrogenázou a aldehyddehydrogenázou<sup>42</sup>. Konverzia propanolu na kyselinu propiónovú prebieha v dvoch stupňoch. V prvom dochádza k dehydrogenácii propanolu na propionaldehyd a ten je následne dehydrogenovaný na kyselinu propiónovú.

Moderné molekulárno biologické metódy ukázali, že bakteriálne kmene využívané v klasických fermentáciách na produkciu kyseliny octovej a ďalších organických kyselín boli iba začiatkom ich využívania v biotechnológiách. Génový potenciál týchto baktérií pre syntézu a premenu pre človeka významných produktov je oveľa bohatší a je iba otázkou času, kedy ho človek dokáže využiť oveľa plnšie jednak pre produkciu bielkovín, ale aj z hľadiska environmentálnych vzťahov.

#### LITERATÚRA

1. De Ley J., Grilis M., Swings J., v knihe: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg N. R., Holt J. G., ed.), sv. 1, str. 267. Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
2. De Ley J., Swings J., Gossalé F., v knihe: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg N. R., Holt J. G., ed.), sv. 1, str. 268. Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
3. De Ley J., Swings J., v knihe: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg N. R., Holt J. G., ed.), sv. 1, str. 275. Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
4. De Ley J., Swings J., Holt J. G., v knihe: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg N. R., Holt J. G., ed.), sv. 1, str. 210. Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
5. Seurinck J., Van de Voorde A., Van Montagu M.: *Nucleic Acids Res.* 11, 4409 (1983).
6. Yamada Y., Murakami M.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 3627 (1985).

7. Grones J., Turňa J.: *Biologia* 46, 1103(1991).
8. Grones J., Turňa J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1162, 323 (1993).
9. Tagami H., Tayama K., Tohyama T., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y., Horinouchi S., Beppu T.: *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 161 (1988).
10. Grones I, Turňa J.: *Nucl. Acids Res.* 20, 3513 (1992).
11. Grones J., Turňa J.: *Folia Microbiol.* 37, 353 (1992).
12. Ohmori S. Uozumi T., Beppu T.: *Agric. Biol. Chem.* 46, 381 (1982).
13. Masuda M., Kawasaki H., Tanimura K.: *Hakkokugaku* 61, 15(1983).
14. Valla S., Coucheron D. H., Kijosbakhen J.: *J. Bacteriol.* 7(55), 336(1986).
15. Valla S., Coucheron D. H., Kijosbakhen J.: *Mol. Gen. Genet.* 208, 76 (1987).
16. Fujiwara M., Fukushi K., Takai M., Hayashi J., v knihe: *Cellulose* (Kenedy J. F., Phillips G. O., Williams P. A., ed), str. 2083. Ellis Harwood, Chichester 1989.
17. Fujiwara M., Fukushi K., Takai M., Hayashi J., Okumura H., Kawamura Y.: *Biotechnol. Lett.* 14, 593(1992).
18. Takeda Y., Shimizu T.: *J. Ferment. Bioengin.* 73, 89 (1992).
19. Grones J., Škereňová M., Bederková K., Turňa J.: *Biologia* 44, 1181 (1989).
20. Okumura H., Uozumi T., Beppu T.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 1011 (1985).
21. Tanouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Horinouchi S., Beppu T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1899(1994).
22. Fomenkov A., Xiao J., Xu S.: *Gene* 158, 143 (1995).
23. Grones J., Škereňová M., Turňa J.: *Biologia* 46, 673 (1991).
24. Grones J., Turňa J.: *Folia Microbiol.* 37, 395 (1991).
25. Grones J., Králová A., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 26 (1993).
26. Grones J., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 942 (1995).
27. Grones J., Bencová K.: *Folia Microbiol.* 39, 99 (1994).
28. Ameyama M., Adachi O.: *Methods Enzymol.* 89, 450 (1992).
29. Matsushita K., Takaki Y., Shinagawa E., Ameyama M., Adachi O.: *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 304 (1992).
30. Kondo K., Beppu T., Horinouchi S.: *J. Bacteriol.* 777, 5048 (1995).
31. Harms N., De Vries G. E., Maurer K., Hoogendijk J., Stouthamer A. H.: *J. Bacteriol.* 169, 3969 (1987).
32. Takemura H., Kondo K., Horinouchi S., Beppu T.: *J. Bacteriol.* 775, 6857 (1993b).
33. Beppu T.: *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 64, 121(1993).
34. Matsushita K., Yakushi T., Takaki Y., Toyama H., Adachi O.: *J. Bacteriol.* 777, 6552 (1995).
35. Tamaki T., Horinouchi S., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y., Beppu T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 292 (1989).
36. Fukaya M., Takemura H., Okumura H., Kawamura Y., Horinouchi S., Beppu T.: *J. Bacteriol.* 772, 2096 (1990).
37. Ner S. S., Bhayana V., Bell A. W., Giles I. G., Duckworth H. W., Blexhan D. P.: *Biochemistry* 22, 5243(1983).
38. Wood D. D., Williamson L. R., Herbert H. H., Krause D. C.: *J. Bacteriol.* 169, 3564 (1987).
39. Donald L. J., Molgaat G. F., Duckworth H. W.: *J. Bacteriol.* 777, 5542(1989).
40. Marathe S., Connerton I. F., Fincham J. R.: *Mol. Cell. Biol.* 10, 2638 (1990).
41. Kulhánek M.: *Adv. Appl. Microbiol.* 34, 141 (1989).
42. Ameyama M., Shinagawa E., Matsushita K., Adachi O.: *Agric. Biol. Chem.* 45, 851 (1981).
43. Quazi G. N., Parshad R., Verma V., Chopra C. L., Buse R., Träger M., Onken U.: *Enzyme Microb. Technol.* 13, 504(1991).
44. Weenk G., Olivje W., Harder W.: *Appl. Microbiol. Technol.* 20, 400(1984).
45. Shinagawa E., Matsushita K., Adachi O., Ameyama M.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 1517(1984).
46. Švitel J., Šturdík E.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53, 53 (1995).

**V. Bilská** (*Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **The Use of Acetic Acid Bacteria in Biotechnology for the Production of Organic Acids**

Acetic acid bacteria are well known by their capabilities to produce a wide spectrum of biotechnologically important products. Components of the cells and their metabolic products, such as cryptic plasmids, restriction endonucleases and methyltransferases, and enzymes of saccharide metabolism, have found versatility in modern biotechnologies. On an industrial scale, the ability to produce organic acids, e.g., acetic acid, gluconic acids, and propionic acid, is used.