

Urszula Guzik, Danuta Wojcieszńska, Marta Krysiak
Uniwersytet Śląski, Katedra Biochemii, Katowice

Ewa Kaczorek
Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Poznań

Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych

Wprowadzenie

Ropa naftowa jest mieszaniną węglowodorów, związków heteroorganicznych oraz składników nieorganicznych. Do węglowodorów należą alkanany, związki aromatyczne oraz węglowodory nienasycone – alkeny i alkiny. Heteroorganiczne związki zawierają głównie atomy siarki, azotu i tlenu [14].

Do środowiska naturalnego ropa naftowa oraz produkty jej przetworstwa mogą dostawać się w wyniku różnych awarii i wycieków, do których dochodzi w czasie jej wydobycia, podczas procesu przerobu w rafineriach oraz transportu i magazynowania. W związku z tym obserwuje się zanieczyszczenie gruntów i wód w pobliżu rurociągów, rafinerii, stacji benzynowych, czy też innych miejsc, gdzie przechowywane są produkty ropopochodne [14, 18]. Większość składników ropy naftowej jest związkami toksycznymi dla organizmów żywych. Mogą one kumulować się w roślinach i przedostawać do kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego. Szkodliwe działanie ropy naftowej w środowisku wynika też z jej oleistej konsystencji. Warstwa węglowodorów pokrywająca powierzchnię wody lub gruntu utrudnia dostęp tlenu do niżej położo-

nych warstw [5, 23, 27]. Badania wykazały, że zdolność do wykorzystania węglowodorów, jako jedyne źródła węgla i energii, jest bardzo powszechna i nie ogranicza się do żadnej szczególnej grupy mikroorganizmów. Przykładami takich drobnoustrojów są zarówno przedstawiciele *Prokariota*, jak i *Eukariota*. Są wśród nich gram-ujemne pałeczki i ziarniaki, gram-dodatnie ziarniaki i przetrwalnikujące pałeczki, maczugowce, promieniowce, drożdże, grzyby, a nawet niektóre algi [1, 15, 38], jednak żaden z mikroorganizmów nie jest zdolny do przeprowadzania biodegradacji wszystkich rodzajów węglowodorów; przyswajają one tylko wybrane związki o takich strukturach chemicznych, z jakimi potrafią reagować ich enzymy [1, 15, 17].

Ze względu na dużą różnorodność szlaków degradacyjnych, interesującym wydaje się przedstawienie poznanych szlaków mikrobiologicznej degradacji alkanów oraz charakterystyka ich kluczowych enzymów. Poznanie mechanizmów rozkładu tych związków umożliwi lepsze wykorzystanie mikroorganizmów w remediacji środowisk skażonych.

Szlaki mikrobiologicznej degradacji alkanów

Alkany są nasyconymi węglowodorami zbudowanymi jedynie z atomów węgla i wodoru. Dzielą się na związki prostolącuchowe, cykliczne (cykloalkany) i rozgałęzione (izoalkany). Stanowią one do 50% ropy naftowej, w zależności od jej źródła [5, 23, 26].

Alkany są najmniej reaktywną klasą wśród związków organicznych [41]. Wiązanie C-H w alkanach jest trudne do aktywacji, ze względu na małą różnicę elektroujemności

budujących je atomów [4]. Aby przezwyciężyć barierę energetyczną tego wiązania mikroorganizmy wykształciły odpowiednie metaloenzymy [30, 36].

Najbardziej znaczącą właściwością fizyczną alkanów jest bardzo niska rozpuszczalność w wodzie, zdeteminowana przez niepolarny charakter wiązań. Cecha ta pogłębia się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej alkanu [26, 40].

Istnieją trzy możliwe drogi absorpcji alkanów przez bakterie: w postaci związków rozpuszczalnych (alkany o bardzo niskich masach cząsteczkowych), poprzez makrokrople i mikrokrople. Dokładnie nie poznano transportu do komórki alkanów rozpuszczalnych w wodzie. Prawdopodobnie mechanizmy te różnią się w zależności od gatunku bakterii, masy cząsteczkowej konkretnego alkanu oraz od fizyko-chemicznych warunków środowiska [6, 24, 41]. Niewiele organizmów ma zdolność do absorpcji makrokropel – zdecydowana większość mikroorganizmów transportuje alkanu poprzez mikrokrople. W celu dyspersji kropli bakterie wydzielają różnorodne biosurfaktanty [6, 24]. Powstałe krople są zamykane wewnątrz miceli surfaktantu. Aby mogły się one przedostać do komórki bakterii, mikroorganizmy wykształciły mechanizmy przystosowawcze. Wiele z nich charakteryzuje się wysoce hydrofobową powierzchnią komórki, co pozwala im na niej wiązać węglowodorowe krople lub przechodzić podczas wzrostu z fazy wodnej do organicznej fazy węglowodorowej. Transport przez błonę jest najczęściej procesem biernym, chociaż istnieją wyjątki: np. *Acinetobacter* HO1-N, bakteria zdolna do wzrostu na *n*-heksanie, przyswaja węglowodory poprzez zamykanie ich w błonowych mikropęcherzykach, które są następnie aktywnie transportowane do wnętrza komórki. Również bakterie z rodzaju *Nocardia*, zdolne do degradacji węglowodorów, tworzą zewnątrzkomórkowe struktury, takie jak pęcherzyki i tubule [6, 24, 26, 40].

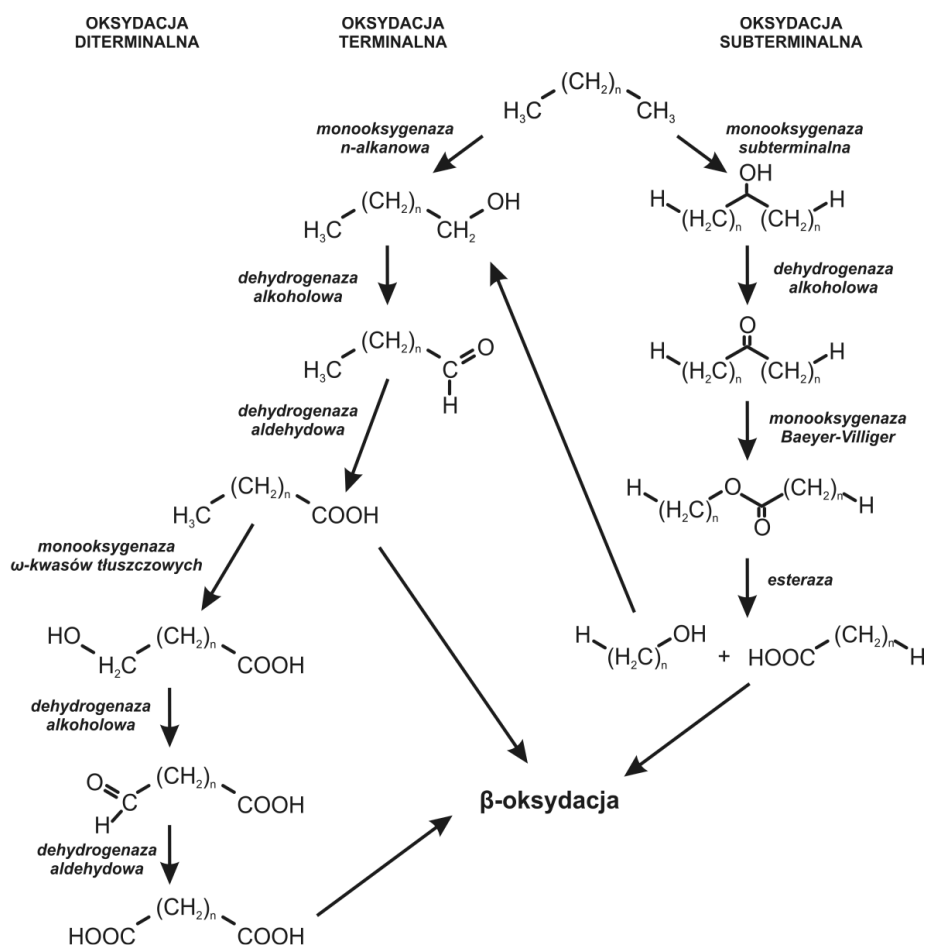
Przebieg mikrobiologicznej degradacji jest zależny od struktury chemicznej związków oraz ich stężenia. Węglowodory ropy naftowej można uszeregować pod względem podatności na biodegradację w następującej kolejności (od najłatwiej do najtrudniej degradowanych): liniowe alkanu C₁₀–C₂₅, węglowodory gazowe C₂–C₄, alkanu C₅–C₉, alkanu rozgałęzione do C₁₂, alkeny C₂–C₁₁, rozgałęzione alkeny, cykloalkany oraz węglowodory mono- i poliaromatyczne. W tym samym porządku maleje ilość wyizolowanych drobnoustrojów, wykazujących zdolność do wzrostu

w obecności wymienionych grup substratów. Czynnikiem środowiskowymi, które wpływają na szybkość rozkładu węglowodorów są: zawartość tlenu, temperatura, odczyn oraz obecność substancji pokarmowych i ksenobiotyków [1, 5, 15, 17, 23].

Tlenowa biodegradacja alkanów

Biodegradacja większości substancji ropopochodnych przebiega szybciej w warunkach tlenowych. Tlenowe bakterie degradujące alkanu wykorzystują O₂ jako substrat do aktywacji cząsteczki alkanu [5, 17, 36].

Istnieją trzy podstawowe szlaki biodegradacji alkanów prostolanicowych, które przedstawiono na rysunku 1; to oksydacja: terminalna, subterminalna i diterminalna. Podczas oksydacji terminalnej dochodzi do insercji aktywnego tlenu do wolnego końca łańcucha alkilowego – z wytworzeniem alkoholu pierwszorzędowego – natomiast podczas oksydacji subterminalnej utlenieniu ulega wewnętrzna grupa metylenowa, w wyniku czego powstaje alkohol drugorzędowy [17, 23, 26]. Następnie w obu szlakach działa dehydrogenaza alkoholowa, która utlenia alkohole



Rys. 1. Szlaki tlenowej biodegradacji alkanów prostolanicowych [19]

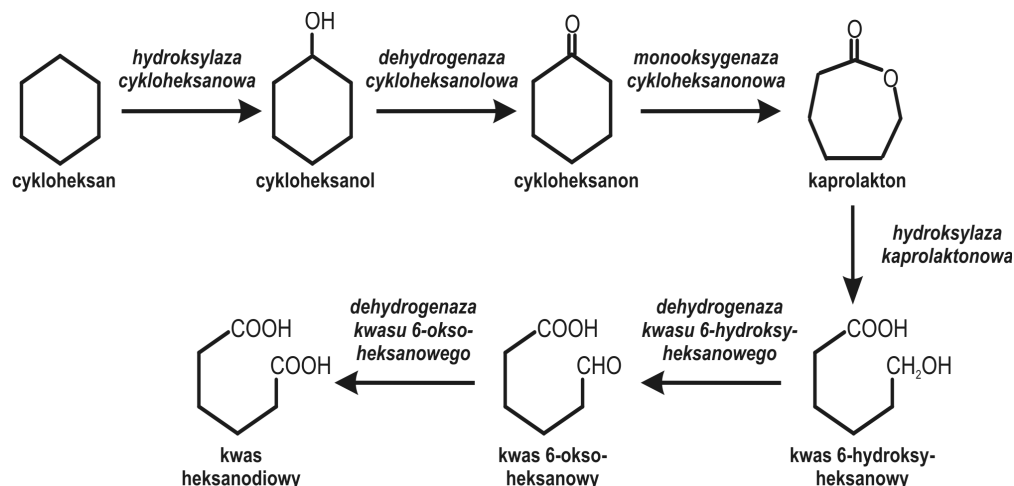
pierwszorzędowe do aldehydów, natomiast drugorzędowe – do ketonów. Kolejną reakcją podczas oksydacji terminalnej katalizuje dehydrogenaza aldehydowa, która utlenia grupę aldehydową do karboksylowej, natomiast w oksydacji subterminalnej działa monooksygenaza Baeyer-Villiger, która przekształca ketony do estrów, włączając atom tlenu do łańcucha węglowego. Estry ulegają hydrolizie pod wpływem esteraz [7, 13]. Produktami tego rozszczepienia są kwasy karboksylowe (włączane w centralny metabolizm) oraz alkohol, który na drodze oksydacji terminalnej zostaje przekształcony do kwasu karboksylowego. Trzecim szlakiem degradacji jest oksydacja diterminalna, inaczej ω -oksydacja, czyli oksydacja obu końców łańcucha węglowego. W procesie tym, po utlenieniu jednej z końcowych grup alkanu włącza się monooksygenaza kwasów tłuszczowych, utleniająca końcowy węgiel po przeciwnej stronie. Następnie, w wyniku działania dehydrogenaz alkoholowej i aldehydowej, powstaje kwas dikarboksylowy. Kwasy tłuszczowe powstałe w każdym z opisanych szlaków podlegają aktywacji z udziałem syntetazy acylo-CoA i w tej postaci wchodzi do szlaku β -oksydacji, który generuje cząsteczki acetylo-CoA [18, 31].

Szczególnym przypadkiem jest utlenianie metanu. Monooksygenaza metanowa katalizuje powstanie metanolu, który jest utleniany do formaldehydu przez dehydrogenazę metanolową, a następnie – przez dehydrogenazę formaldehydową – do kwasu mrówkowego. Ten ostatni może być przekształcany do dwutlenku węgla przez dehydrogenazę mrówczanową. Poza tym formaldehyd może być też wykorzystany przez komórkę do biosyntezy wielowęglowych związków w szlaku rybulozowym lub serynowym [26].

Rozpatrując zależność pomiędzy strukturą alkanów, a zdolnością do ich degradacji, można stwierdzić iż wysoko rozgałęzione związki są bardziej odporne na biodegradację, w porównaniu ze związkami prostolącuchowymi. Szczególnie odporne są izomery *anteizo-* (rozgałęzione przy węglu w pozycji β) i cząsteczki z czwartorzędowym atomem węgla, ponieważ mogą stanowić przeszkodę przestrzenną dla utleniających je enzymów. Takie uogólnienie nie dotyczy każdego związku – np. opisano utlenienie cząsteczki 2,2-dimetyloheptanu do

kwasu 2,2-dimetyloheptanowego przez szczep *Achromobacter* sp. Pristan (2,6,10,14-tetrametylopentadekan); alkan izoprenoidowy jest na tyle trudnogradualnym składnikiem ropy naftowej, że służy jako marker w środowiskowych analizach zawartości węglowodorów – dlatego jego degradacja została dobrze zbadana. Może ona przebiegać na drodze β - lub ω -oksydacji, w których odłączane są na przemian jednostki dwu- i trójwęglowe. Biodegradację pristanu przeprowadzają bakterie z rodzaju *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* i *Nocardia* [17, 26, 40]. Nakajima i in. opisali szczep *Rhodococcus* sp., który jest zdolny do degradacji innych izoalkanów: fytanu (2,6,10,14-tetrametyloheksadekan), norpristanu (2,6,10-trimetylopentadekan) i famesanu (2,6,10-trimetylododekan) – jako jedynych źródeł węgla i energii. We wszystkich przypadkach jednostki izopropylowe są utleniane do alkoholi pierwszorzędowych i ostatecznie do odpowiednich kwasów karboksylowych [18, 23, 31]. Z kolei Cox i in. opisali *Mycobacterium* sp. – bakterię zdolną do degradacji fytanu, norpristanu, 2,6,10-trimetylotetradekanu i 2,6,10,14-tetrametyloheptadekanu. Podczas degradacji tych związków nie obserwowano utlenienia jedynie końca izopropylowego, natomiast zawsze produktem początkowych etapów utlenienia był alkohol pierwszorzędowy [40].

Biologiczne utlenianie cyklicznych alkanów zwykle skutkuje wytworzeniem analogicznych kwasów dikarboksylowych, które są dalej metabolizowane w komórce. Utlenianie związków cyklicznych przebiega podobnie u filogenetycznie różnorodnych bakterii. Większość wyizolowanych mikroorganizmów degradujących węglowodory cykliczne posiada enzymy utleniające związki zawierające od 5 do 7 atomów węgla w pierścieniu. Na rysunku 2 przedstawiono szlak biodegradacji cykloheksanu występujący u *Acinetobacter*, *Brevibacterium* i *Arthrobacter* [1, 28].



Rys. 2. Szlak biodegradacji cykloheksanu [5]

Pierwszym etapem jest utlenianie cykloheksanu do cykloheksanolu, prowadzone przez odpowiednią hydroksylazę. Produkt ten ulega dehydrogenacji do cykloheksanonu. Cykloheksanon jest utleniany przez monoooksygenazę Baeyer-Villiger, wprowadzającą do pierścienia atom tlenu – jest ona kluczowym enzymem tego szlaku. W miejscu insercji tlenu, pierścień powstałego kaprolaktonu zostaje rozszczepiony przez hydroksylazę kaprolaktonową i powstaje kwas 6-hydroksyheksanowy. Kolejne reakcje dehydrogenacji przekształcają jego grupę hydroksylową do aldehydowej i ostatecznie do karboksylowej. Produktem utlenienia cykloheksanu jest kwas heksanodiowy, dalej rozkładany w szlaku β -oksydacji [7, 10, 13].

Niewiele bakterii jest zdolnych do degradacji cyklicznych alkanów o dużych pierścieniach. Wyizolowany szczep *Rhodococcus ruber* CD₁-411, jako jeden z nielicznych jest zdolny do wykorzystania cykloheksanu jako jedyne źródła węgla. Szlak degradacji tego związku jest analogiczny do utleniania cykloheksanu [10, 16].

Biodegradacja alkanów w warunkach anoksji

Metabolizm alkanów w warunkach beztlenowych jest słabiej poznany niż metabolizm tlenowy i znacznie się od niego różni. Przy utlenianiu alkanów w warunkach anoksji konieczne są alternatywne akceptory elektronów [2, 45]. Najlepiej zbadanymi akceptorami elektronów zastępującymi tlen są: dwutlenek węgla, sulfoniany, azotany i jony żelaza. Jednak elektrony może przyjmować także wiele innych metali, oksyanionów, a nawet związków organicznych. Niektóre mikroorganizmy są zdolne do prowadzenia różnorodnych form respiracji beztlenowej, jednak dostępność poszczególnych akceptorów elektronów zależy od typu fizjologicznego bakterii oraz rozpowszechnienia tych związków w danym środowisku [33, 44]. Wszystkie bakterie redukujące sulfoniany, zdolne do degradacji alkanów, należą do δ -Proteobakterii, natomiast szczepy denitryfikujące zaliczono do subklas β i γ Proteobakterii [29, 45].

Do tej pory nie udało się wyizolować czystych szczepów, które przeprowadzają beztlenowe utlenianie metanu,

jednak eksperymenty prowadzone na morskich osadach dennych wykazały, że w proces ten zaangażowane są konsorcja złożone z *archea* i bakterii redukujących sulfoniany, blisko spokrewnione z *Methanosarcinales* i *Desulfosarcina*. Mikroorganizmy te przekształcają metan do CO₂ i H₂, następnie wykorzystując wodór do utlenienia sulfonianów. W konsorcjach, dzięki asocjacji bakterii i *archea*, możliwy jest transport wodoru między tymi mikroorganizmami przez dyfuzję cząsteczkową. Przypuszcza się, że 8 elektronów powstałych z rozpadu cząsteczki metanu jest transportowanych pojedynczo bądź parami. Taki stopniowy transport pomiędzy partnerami wydaje się być najbardziej korzystny termodynamicznie [29, 44].

Żaden z wyizolowanych mikroorganizmów, zdolnych do degradacji alkanów o większych masach cząsteczkowych, nie jest w stanie wykorzystywać metanu jako substratu pokarmowego [29]. Analizowane szczepy zazwyczaj wykazują specyficzność substratową; np. szczep BuS5 – bakteria należąca do *Desulfosarcina/Desulfococcus*, redukująca sulfoniany – utlenia jedynie propan i butan. Z kolei *Azoarcus* sp. HxN1 – bakteria denitryfikacyjna – utlenia alkanany o długości łańcucha C₆–C₈, podczas gdy *Desulfobacterium* Hdx3 metabolizuje alkanany C₁₂–C₂₀. Mikroorganizmy wytworzyły dwa główne szlaki beztlenowego utleniania alkanów. Pierwszy jest związany z aktywacją alkanu w subterminalnej pozycji poprzez dodanie cząsteczki fumaranu, co prowadzi do powstania alkilowej pochodnej bursztynianu. Reakcja ta zachodzi dzięki tworzeniu organicznego intermediatu rodnikowego, zwykle glicyloвого. Produkt reakcji jest następnie przyłączany do koenzymu A. Powstały acylo-CoA wchodzi w szlak β -oksydacji. Drugi szlak został opisany tylko dla propanu; polega on na kondensacji cząsteczki fumaranu z końcowym atomem węgla tego alkanu [26, 44].

Biodegradacja alkanów cyklicznych w warunkach anoksji należy do najmniej zbadanych procesów. Townsend i in. wykazali, że proste, cykliczne związki (takie jak cyklopentan, cykloheksan i ich homologi) z podstawionymi grupami metylowymi i etylowymi są szybko utleniane w obecności sulfonianów. Związki cykliczne o większej ilości podstawników są bardziej odporne na degradację [33].

Kluczowe enzymy bakteryjne zaangażowane w rozkład alkanów

Monoooksygenazy to enzymy, które katalizują insercję pojedynczego atomu tlenu, pochodzącego z tlenu cząsteczkowego, do organicznych substratów. Aby przeprowadzić ten typ reakcji monoooksygenazy muszą aktywować tlen, ponieważ jego bezpośrednia reakcja z organicznym substratem

nie jest możliwa. Zwykle w tym celu wykorzystywane są kofaktory, przenoszące elektrony na molekularny tlen w celu jego aktywacji [32, 36].

Bezpośrednio związane z biodegradacją alkanów są monoooksygenazy alkanowe, inaczej nazywane hydroksy-

lazami alkanowymi, utleniające atomy węgla w pozycji α bądź ω alkanów niecyklicznych oraz monooksygenazy Baeyer-Villiger, które w szlaku oksydacji subterminalnej wprowadzają pojedynczy atom tlenu do łańcucha węglowego, bądź pierścienia ketonów [7, 13, 17].

Monooksygenazy alkanowe

W zależności od długości łańcucha węglowego alkanu wyróżnia się trzy typy monooksygenaz. Do pierwszego zalicza się monooksygenazę metanową i enzymy do niej podobne, utleniające alkany C_1 – C_4 . Drugi typ stanowią hydroksylazy zawierające żelazo niehemowe oraz monooksygenazy cytochromowe P450; utleniające alkany od pentanu do heksadekanu. Enzymy zaliczane do trzeciego typu utleniają alkany siedemnastowęglowe, bądź dłuższe [3, 20, 34, 35].

Monooksygenazy metanowe odgrywają kluczową rolę w obiegu węgla w biosferze. Enzymy te występują w dwóch formach. Prawie wszystkie tlenowe organizmy degradujące metan posiadają – związaną z błoną komórkową – monooksygenazę metanową zawierającą miedź pMMO (ang. *particulate Methane Monooxygenase*). Niektóre z nich, np. *Methylococcus capsulatus*, w warunkach ograniczonego dostępu do miedzi inicjują ekspresję rozpuszczalnej monooksygenazy metanowej sMMO (ang. *soluble Methane Monooxygenase*) [35].

Enzymy należące do rodziny sMMO to niehemowe żelazo-zależne monooksygenazy, które wykorzystują dwa atomy żelaza jako kofaktory [12, 28, 32, 42, 43]. Katalizują one hydroksylację i epoksydację małych hydrofobowych cząsteczek alkanów i alkenów (również halogenowanych); związków aromatycznych takich jak fenol i tetrahydrofuran. Enzymy sMMO złożone są z trzech komponentów: hydroksylazy (MMO-H), reduktazy (MMO-R) i białka regulatorowego (MMO-B). Najlepiej scharakteryzowanym członkiem tej rodziny jest rozpuszczalna monooksygenaza metanowa wyizolowana z *M. capsulatus*. W centrum aktywnym hydroksylazy zachodzi reakcja między metanem i tlenem, prowadząca do powstania metanolu. Reduktaza związana z FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) jest akceptorem elektronów pochodzących z NADH (zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). Elektrony są przekazywane ze zredukowanej flawiny do dwóch atomów żelaza (III) w centrum aktywnym hydroksylazy [19, 32, 35]. Dzięki tej reakcji, enzym ze stanu spoczynkowego formy utlenionej $MMO-H_{ox}$ przechodzi w aktywną formę zredukowaną $MMO-H_{red}$, gdzie atomy żelaza znajdują się na II stopniu utlenienia [9, 19]. Następnie, kompleks

(utworzony z centrum diżelazowego (II) MMO-H i komponentu MMO-B) reaguje z tlenem cząsteczkowym. Tlen jest aktywowany przez atomy żelaza centrum aktywnego, w wyniku czego powstaje wysokospinowy intermediat Q; zdolny do wiązania substratu i jego hydroksylacji [9, 32]. Reakcja pomiędzy intermediatem Q a alkanowym substratem ma charakter rodnikowy. Atom wodoru jest odrywany od substratu i przyłączany do intermediatu Q. Powstaje hydroksylowany intermediat Q i wolny rodnik alkilowy, który następnie reaguje z powstałą w centrum aktywnym grupą hydroksylową. W wyniku tej reakcji tworzy się hydroksylowany produkt [25]. Cykl katalityczny kończy redukcja prowadzona przez komponent MMO-R, podczas której produkt opuszcza centrum aktywne [9].

Szczegółowo opisana została monooksygenaza zawierająca miedź (pMMO) szczepu *Methylococcus capsulatus*. Składa się ona z hydroksylazy pMMO-H i reduktazy pMMO-R. Możliwe, że zawiera również białkowy mediator, regulujący jej aktywność. Stworzono dwa modele transportu elektronów w pMMO. W pierwszym reduktaza przyjmuje elektrony z NADH i przekazuje je bezpośrednio do hydroksylazy. Drugi model uwzględnia obecność mediatora. Reduktaza jest akceptorem elektronów z NADH oraz przenosi je do mediatora, który następnie przekazuje elektrony hydroksylazie [22, 32].

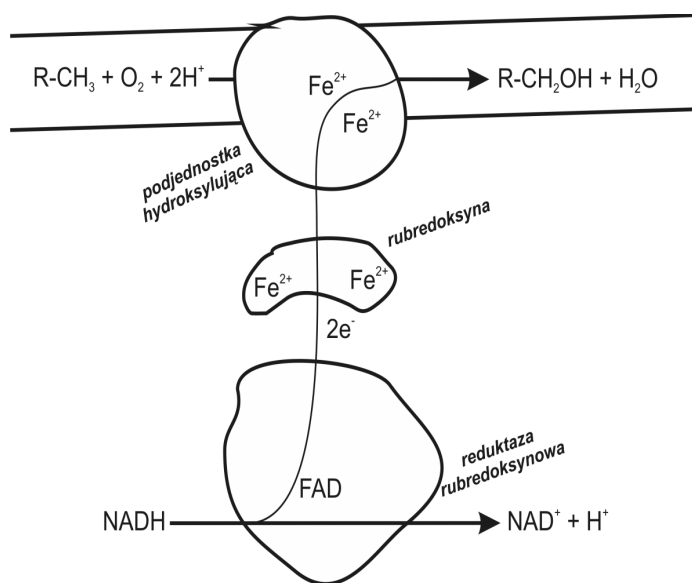
Enzymy z grupy pMMO charakteryzują się większą specyficznością substratową niż enzymy sMMO, jednak mogą one działać na dłuższe alkany i kilka innych rodzajów cząsteczek hydrofobowych [12, 28, 35, 42, 43].

Wydaje się, że enzymy związane z degradacją etanu, propanu i butanu należą do kilku odrębnych klas, jednak wykazują podobieństwo do sMMO i pMMO. Wyizolowana z bakterii *Pseudomonas butanovora* trójkomponentowa monooksygenaza butanowa, zawierająca żelazo niehemowe (BMO), okazała się być podobna do sMMO i hydroksylować w pozycji terminalnej alkany o długości łańcucha od C_2 do C_9 , ale jest ona prawie nieaktywna w stosunku do metanu [35]. Z kolei monooksygenaza propanowa wyizolowana z *Gordonia* sp. TY-5 jest również podobna do sMMO pod względem sekwencji aminokwasowej, ale – w odróżnieniu od niej i BMO – charakteryzuje się wysoką specyficznością substratową i utlenia jedynie propan w pozycji β [35, 36].

W hydroksylację alkanów C_5 – C_{16} zaangażowane są enzymy należące do dwóch klas. Pierwszą tworzą enzymy spokrewnione z cytochromem P450 (CYPs), natomiast drugą – hydroksylazy alkanowe (pAHs) [3, 20, 34].

Pierwsza szczegółowo scharakteryzowana hydroksylaza alkanowa AlkB została wyizolowana z *Pseudomonas putida*

GPO1. Przeprowadza ona początkowy etap asymilacji alkanów o długości łańcucha C_5 – C_{12} , polegający na utlenieniu węgla w pozycji α . Hydroksylaza alkanowa AlkB, podobnie jak sMMO, należy do monooksygenaz zależnych od żelaza niehemowego [35]. Jest ona zbudowana z trzech podjednostek: hydroksylazy, rubredoksyny i reduktazy rubredoksynowej. Podjednostka hydroksylująca alkan odpowiada za wprowadzenie atomu tlenu do łańcucha alkanów; dodatkowo może też katalizować powstawanie kwasów tłuszczowych i epoksydów. Podjednostka ta jest zakotwiczona w wewnętrznej błonie komórkowej. Jej 6 hydrofobowych α -helis tworzy kanał, przez który cząsteczka alkanu przechodzi na cytoplazmatyczną stronę błony i reaguje z dwużelazowym centrum aktywnym tej podjednostki [8, 38]. Rubredoksyna to przenośnik elektronowy, który zawiera przynajmniej jedno centrum aktywne o strukturze tetrahedralnej [38]. Hydroksylaza rubredoksynowa jest odpowiedzialna za redukcję FAD, z którym jest związana – kosztem NADH – i przenosi elektrony na rubredoksynę. Transport elektronów został przedstawiony na rysunku 3 [36, 38].



Rys. 3. Struktura hydroksylazy alkanowej AlkB i kierunek transportu elektronów [28]

Jedynie kilka spośród pAHs jest zdolnych do utlenienia alkanów o długościach łańcucha C_5 – C_{12} ; nazwano je pAH1. Zostały one wyizolowane z *P. putida* GPO1 i innych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz niektórych γ -Proteobakterii, np. *Alcanivorax borkumensis* i *Marinobacter aquaeolei* [35].

Większość hydroksylaz alkanów C_5 – C_{16} należy do grupy pAH2. Nie są one zbyt aktywne w stosunku do alkanów krótszych niż C_{10} – preferują cząsteczki o dłuższych łańcuchach [35]. Do bakterii posiadających enzymy pAH2 należą m.in. *Acinetobacter* sp. ADP1 i *Pseudomonas*

fluorescens KOB2Δ1 – obie zdolne do utlenienia alkanów dłuższych niż C_{12} [37].

Drugą grupą enzymów degradujących alkanów o średniej długości łańcucha są hemozależne monooksygenazy, zwane również monooksygenazami cytochromowymi P450 (CYPs). Są one najbardziej rozpowszechnione wśród organizmów eukariotycznych, jednak występują również u bakterii; są to monooksygenazy zależne od hemu typu b [3, 20, 32, 34].

W zależności od budowy systemu transportu elektronów, CYPs można podzielić na cztery klasy:

- Monooksygenazy klasy I zbudowane są z trzech składników: domeny hemowej, ferredoksyny (Fd) oraz NADH – zależnej reduktazy ferredoksynowej zawierającej FAD (FdR). Do grupy tej należy wiele bakteryjnych i mitochondrialnych enzymów. Bakteryjne monooksygenazy cytochromowe P450 są zwykle białkami rozpuszczalnymi.
- Klasa II to dwuskładnikowe enzymy eukariotyczne. Zarówno ich domena hemowa, jak i reduktaza zawierająca FAD lub FMN (mononukleotyd flawinoadeninowy), są związane z błoną.
- Do klasy III zalicza się enzymy zbudowane podobnie jak enzymy klasy II, jednak obie domeny są utworzone przez jeden polipeptyd. Ułatwia to transport elektronów i wpływa na wzrost szybkości reakcji, w porównaniu do reakcji katalizowanej przez enzym dwupodjednostkowy. Enzymy tej klasy mogą być zarówno związane z błoną, jak i rozpuszczalne; są obecne u przedstawicieli *Prokariota* i *Eukariota*.
- Klasa IV to monooksygenazy zawierające takie same składniki jak enzymy klasy I, jednak ich domeny są połączone w jeden polipeptyd [3, 20, 32, 34].

CYPs, do aktywacji O_2 przez grupę prostetyczną hemu, wymagają elektronów. Pochodzą one najczęściej z NADH lub NADPH (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), jednak mechanizm przenoszenia elektronów na kofaktor hemowy może być różnorodny. Reakcja hydroksylacji rozpoczyna się od przyłączenia organicznego substratu (XH) do enzymu i przeniesienia jednego elektronu na żelazo hemowe, co powoduje jego redukcję. Następnie, w wyniku przyłączenia cząsteczki tlenu powstaje intermedial nadtlenny, który jest redukowany przez drugi elektron. Podwójna protonacja dystalnego atomu tlenu prowadzi do rozszczepienia wiązania O-O, efektem czego jest powstanie reaktywnego intermediatu. Jest on zdolny wprowadzić atom tlenu do organicznego substratu i utworzyć kompleks produkt-enzym. Po uwolnieniu produktu enzym wchodzi w stadium spoczynku ze

związaną cząsteczką wody, jako szóstym ligandem hemu [3, 20, 34].

Szczepy bakterii posiadające hydroksylazy należące do rodziny monooksygenaz klasy I są zdolne do degradacji alkanów o długości C_5 – C_{10} . Pierwszym scharakteryzowanym członkiem tej rodziny była monooksygenaza CYP153A1 wyizolowana z *Acinetobacter* sp. Podobne enzymy zostały znalezione w różnorodnych bakteriach [3, 20, 28, 34, 36], takich jak *Alcanivorax borkumensis*, *Sphingomonas* sp. HXN-200, czy *Oleomonas sagaranensis* HXN-1400 i kilku szczepach *Mycobacterium* sp. Bakterie te zawierają jedną lub więcej monooksygenaz należących do rodziny CYP153; jednak mogą również posiadać hydroksylazy alkanowe pAHs. Kolejnym przedstawicielem rodziny CYP153 jest monooksygenaza CYP153A6 – wyizolowana z *Mycobacterium* sp. HXN-1500 – utleniająca alkany alifatyczne o długościach łańcucha C_6 – C_{11} do 1-alkanoli [3, 11, 20, 34].

Znane są szczepy bakterii degradujące alkany dłuższe niż C_{16} ; zwykle szczepy te zawierają kilka hydroksylaz alkanowych. Te, które wykazują aktywność w stosunku do alkanów o długościach C_{10} – C_{20} zwykle są spokrewnione z hydroksylazą alkanową AlkB *Pseudomonas putida* GPo1 lub monooksygenazą cytochromową P450 *Acinetobacter* sp. EB104. Jednak enzymy, które utleniają alkany dłuższe niż C_{20} wydają się być zupełnie inne; np. *Acinetobacter* sp. M1, degradujący alkany o długości C_{10} – C_{30} , posiada rozpuszczalną hydroksylazę alkanową zależną od jonów miedzi (II). Z kolei szczep *Acinetobacter* DSM 17874 posiada monooksygenazę flawinową Alma, która utlenia alkany C_{20} – C_{31} [26].

Monooksygenazy Baeyer-Villiger (BVMOs) są odpowiedzialne za wprowadzenie atomu tlenu bezpośrednio do łańcucha węglowego aldehydów, bądź ketonów – produktów pośrednich biodegradacji alkanów. BVMOs licznie występują u Prokariotów; spotyka się je również u Eukariotów [7, 13]. Monooksygenazy tego typu zawierają flawinę, w postaci FMN lub FAD – ściśle związaną z enzymem; jako grupą prostetyczną, bądź funkcjonującą jako kosubstrat, w formie koenzymu. W celu hydroksylacji alkanu, flawinozależna monooksygenaza tworzy reaktywny

intermediat. W zależności od stanu uprotonowania, intermediat ten prowadzi nukleofilowy lub elektrofilowy atak na substrat. W przypadku braku odpowiedniego substratu w środowisku reakcji, intermediat peroksyflawinowy rozpada się do utlenionej flawiny i tlenu, w postaci nadtlenu wodoru. W obecności substratu i NAD(P)H intermediat peroksyflawiny podlega redukcji do hydroperoksyflawiny, która po wbudowaniu atomu tlenu do substratu przekształca się w hydroksyflawinę, a ta rozpada się do utlenionej flawiny i cząsteczki wody. Cykl katalityczny zamyka reakcja redukcji flawiny przez NAD(P)H [7, 13].

W zależności od budowy i rodzaju wykorzystywanej flawiny, monooksygenazy Baeyer-Villiger podzielono na dwa typy. BVMOs typu I są jednkompontowymi białkami utworzonymi przez dwie domeny – z każdą z nich ściśle związany jest FAD, w postaci grupy prostetycznej. Enzymy te są specyficzne wobec NADPH, który jest związany z monooksygenazą podczas całego cyklu katalitycznego [39]. Pierwowzorem BVMOs typu I jest monooksygenaza cykloheksanonowa, wyizolowana z *Acinetobacter* sp. NCBI 9871, mogąca utleniać bardzo różnorodne cykliczne ketony i charakteryzująca się chemo-, regio- i enancjoselektywnością. Wśród enzymów tego typu znajdują się również monooksygenaza cykloodekanowa i monooksygenaza cyklopentanonowa [7, 13, 36].

Monooksygenazy Baeyer-Villiger typu II od monooksygenaz typu I zasadniczo różnią się budową i rodzajem kofaktora; są to białka zbudowane z dwóch podjednostek oksygenazowych i jednej podjednostki reduktazowej. Zadaniem podjednostek oksygenazowych jest wprowadzenie do substratu atomu tlenu. Podjednostka reduktazowa jest luźno związana z FMN, który może wykorzystywać NADH i/lub NADPH jako ekwiwalenty redukcyjne. Zredukowana flawina jest przenoszona na podjednostkę oksygenazową [39]. Przykładem monooksygenazy Baeyer-Villiger typu II jest hydroksylaza alkanowa LadA zidentyfikowana u *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, która katalizuje utlenianie alkanów o długościach C_{15} – C_{36} do pierwszorzędowych alkoholi. Należy ona do rodziny bakteryjnych lucyferaz [26].

Podsumowanie

Wydobycie i przetwarzanie ropy naftowej przyczynia się do zanieczyszczenia związkami węglowodorowymi środowiska naturalnego na dużą skalę; stąd niezwykle istotne jest opracowanie wydajnych metod ich biologicznej degradacji. W tym celu niezbędne jest jednak

poznanie szlaków mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów ropopochodnych, kluczowych enzymów tych szlaków oraz wpływu warunków środowiskowych na efektywność procesów bioremediacji. Obecność w środowisku naturalnym organizmów o zwiększonych zdol-

nościach degradacyjnych rodzi nadzieje na powszechne ich zastosowanie w procesach oczyszczania środowisk

zdegradowanych i miejsc niepożądanych wycieków, np. z platform wiertniczych.

Praca wykonana w ramach projektu nr NN304 163337, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Artykuł nadesłano do Redakcji 25.08.2010 r. Przyjęto do druku 11.10.2010 r.

Recenzent: dr Anna Turkiewicz

Literatura

- [1] Abed R.M.M., Safi N.M.D., Köster J., de Beer D., El-Nahal Y., Rullkötter J., Garcia-Pichel F.: *Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds*, Applied and Environmental Microbiology, 68, 1674–1683, 2002.
- [2] Aitken C.M., Jones D.M., Larter S.R.: *Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs*, Letters of Nature, 431, 291–294, 2004.
- [3] Amouric A., Quemeneur M., Grossi V., Liebgott P.P., Auria R., Casalot L.: *Identification of different alkane hydroxylase systems in Rhodococcus ruber strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete*, Journal of Applied Microbiology, 6, 1903–1916, 2010.
- [4] Ayala M., Torres E.: *Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective*, Applied Catalysis A, 272, 1–13, 2004.
- [5] Baek K.H., Yoon B.D., Oh H.M., Kim H.S., Lee I.S.: *Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by Nocardia sp. H17-1*, Geomicrobiology Journal, 23, 253–259, 2006.
- [6] Bardi L., Mattei A., Steffan S., Marzona M.: *Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability*, Enzyme and Microbial Technology, 27, 709–713, 2000.
- [7] Beam M.P., Bosserman M.A., Noinaj N., Wehenkel M., Rohr J.: *Crystal structure of Baeyer-Villiger monoxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway*, Biochemistry, 48, 4476–4487, 2009.
- [8] Bertrand E., Sakai R., Rozhkova-Novosad E., Moe L., Fox B.G.: *Reaction mechanisms of non-heme diiron hydroxylases characterized in whole cells*, Journal of Inorganic Biochemistry, 99, 1998–2006, 2005.
- [9] Blazyk J.L., Gassner G.T., Lippard S.J.: *Intermolecular electron-transfer reactions in soluble methane monoxygenase: a role for hysteresis in protein function*, Journal of the American Chemical Society, 127(49), 17364–17376, 2005.
- [10] Cheng Q., Thomas S.M., Rouviere P.: *Biological conversion of cyclic alkanes and cyclic alcohols into dicarboxylic acids: biochemical and molecular basis*, Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 704–711, 2002.
- [11] Funhoff E.G., Bauer U., Garcia-Rubio I., Witholt B., van Beilen J.B.: *CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation*, Journal of Bacteriology, 188, 5220–5227, 2006.
- [12] Hamamura N., Yeager Ch.M., Arp D.J.: *Two distinct monoxygenase for alkane oxidation in Nocardioides sp. strain CF8*, Applied and Environmental Microbiology, 67, 4992–4998, 2001.
- [13] Iwaki H., Wang S., Grosse S., Bergeron H., Nagahashi A., Lertvorachon J., Yang J., Konishi Y., Hasegawa Y., Lau P.C.K.: *Pseudomonad cyclopentadecanone monoxygenase displaying an uncommon spectrum of Baeyer-Villiger oxidations of cyclic ketones*, Applied and Environmental Microbiology, 72, 2707–2720, 2006.
- [14] Klimiuk E., Łebkowska M.: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
- [15] Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S.-Y., Kubo M.: *Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by Acinetobacter sp.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 94–96, 2001.
- [16] Kostichka K., Thomas S.M., Gibson K.J., Nagarajan V., Cheng Q.: *Cloning and characterization of a gene cluster for cyclododecanone oxidation in Rhodococcus ruber SC1*, Journal of Bacteriology, 183, 6478–6486, 2001.
- [17] Kwapisz E.: *Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*, Biotechnologia, 2(73), 166–188, 2006.
- [18] Lattuari A., Metzger P., Acquaviva M., Bertrand J.-C., Largeau C.: *n-Alkane degradation by Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain SP 17: long chain β -hydroxy acids as indicator of bacterial activity*, Organic Geochemistry, 33, 37–45, 2002.
- [19] Lippard S.J.: *Hydroxylation of C-H bonds at carboxylate-bridged diiron centres*, Philosophical Transactions of the Royal Society A: Biological Sciences, 363, 861–877, 2005.
- [20] Liu L., Schmidt R.D., Urlacher V.B.: *Engineering cytochrome P450 monoxygenase CYP 116B3 for high dealkylation activity*, Biotechnology Letters, 2010, DOI 10.1007/s10529-010-0233-9.
- [21] Murrell J.C., Gilbert B., McDonald I.R.: *Molecular biology and regulation of methane monoxygenase*, Archives of Microbiology, 173, 325–332, 2000.
- [22] Nguyen H.T., Elliott S.J., Yip J.H., Chan S.I.: *The particulate methane monoxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme*, The Journal of Biological Chemistry, 273(14), 7957–7966, 1998.
- [23] Okoh A.I.: *Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants*, Biotechnology and Molecular Biology Review, 1, 38–50, 2006.
- [24] Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R., Banat I.M.: *Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients*, Bioresource Technology, 90, 159–168, 2003.
- [25] Rinaldo D., Philipp D.M., Lippard S.J., Friesner R.A.: *Intermediates in dioxygen activation by methane monoxygenase: a QM/MM study*, Journal of the American Chemical Society, 129(11), 3135–3147, 2007.

- [26] Rojo F.: *Degradation of alkanes by bacteria*. Environmental Microbiology, 11(10), 2477–2490, 2009.
- [27] Silva R.M.P., Rodriguez A.Á., de Oca G.M., Moreno D.C.: *Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa AT18 stain*. Tecnología Química, 26, 70–77, 2006.
- [28] Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B.: *Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria*. Journal of Bacteriology, 184, 1733–1742, 2002.
- [29] Spormann A.M., Widdel F.: *Metabolism of alkylbenzenes, alkanes and other hydrocarbons in anaerobic bacteria*. Biodegradation, 11, 85–105, 2000.
- [30] Stone K.R., Borovik A.S.: *Lessons from nature: unravelling biological C-H bond activation*. Current Opinion in Chemical Biology, 13(1), 114–118, 2009.
- [31] Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.-K., Zotchev S.B.: *Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by Acinetobacter sp. Strain DSM 17874*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 3327–3332, 2007.
- [32] Torres Pazmiño D.E., Winkler M., Glieder A., Fraaije M.W.: *Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications*. Journal of Biotechnology, 146, 9–24, 2010.
- [33] Townsend G.T., Prince R.C., Suffita J.M.: *Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer*. FEMS Microbiology Ecology, 49, 129–135, 2004.
- [34] Urlacher V.B., Eiben S.: *Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application*. Trends in Biotechnology, 24, 324–330, 2006.
- [35] van Beilen J.B., Funhoff E.G.: *Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 13–21, 2007.
- [36] van Beilen J.B., Funhoff E.G.: *Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications*. Current Opinion in Biotechnology, 16, 308–314, 2005.
- [37] van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B.: *Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment*. Oil & Gas Science and Technology, 58(4), 427–440, 2003.
- [38] van Beilen J.B., Wubbolts M.G., Witholt B.: *Genetics of alkane oxidation by Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation, 5, 161–174, 1994.
- [39] van Berkel W.J.H., Kamerbeek N.M., Fraaije M.W.: *Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts*. Journal of Biotechnology, 124, 670–689, 2006.
- [40] Watkinson R.J., Morgan P.: *Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms*. Biodegradation, 1, 79–92, 1990.
- [41] Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B., Throne-Holst M.: *Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 76, 1209–1221, 2007.
- [42] Whyte L.G., Schultz A., van Beilen J.B., Luz A.P., Pelizari V., Labbe D., Greer C.W.: *Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils*. FEMS Microbiology Ecology, 41, 141–150, 2002.
- [43] Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbe D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B.: *Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in Rhodococcus strains Q15 and NRRL B-16531*. Applied and Environmental Microbiology, 68, 5933–5942, 2002.
- [44] Widdel F., Rabus R.: *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*. Current Opinion in Biotechnology, 12, 259–276, 2001.
- [45] Wilkes H., Kühner S., Bolm C., Fischer T., Classen A., Widdel F., Rabus R.: *Formation of n-alkane- and cyclo-alkane-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil*. Organic Geochemistry, 34, 1313–1323, 2003.



Dr Urszula GUZIK – adiunkt Katedry Biochemii Uniwersytetu Śląskiego. Od wielu lat zajmuje się badaniami nad enzymatycznym i genetycznym podłożem mikrobiologicznej degradacji węglodorów.



Dr Danuta WOJCIESZYŃSKA – adiunkt Katedry Biochemii Uniwersytetu Śląskiego. Od wielu lat zajmuje się problemami związanymi z biodegradacją związków aromatycznych, ze szczególnym uwzględnieniem enzymów zaangażowanych w ich rozkład.



Marta KRYSIAK – magistrantka Katedry Biochemii; pod opieką dr Urszuli Guzik napisała w 2010 roku Pracę Licencjacką pt.: „Molekularne podstawy bakteryjnej degradacji alkanów ropopochodnych”.



Dr inż. Ewa KACZOREK – adiunkt w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Od wielu lat zajmuje się wykorzystaniem mikroorganizmów w biodegradacji substancji ropopochodnych, jak również charakterystyką właściwości powierzchniowych bakterii.