

## Priemyselné využitie octových baktérií a charakterizácia génov zodpovedných za produkciu biotechnologicky významných produktov

VLADIMÍRA BILSKÁ

**SÚHRN.** Octové baktérie - čeľaď *Acetobacteriaceae* - majú široké využitie v potravinárskom i biotechnologickom priemysle. Štúdium dôležitých génov, restrikčno-modifikačného systému a rôznych genetických elementov octových baktérií by mohlo prispieť k pochopeniu genetického pozadia priemyselne významných druhov. Podstatný význam majú gény, ktorých génové produkty sa podieľajú na produkcii dôležitých látok ako napr. kyseliny octovej či celulózy. Z hľadiska súčasných technológií je nevyhnutné objasniť úlohu restrikčno-modifikačného systému octových baktérií, aspekty stability buniek pri priemyselnom využití a prítomnosť extrachromozomálnych DNA s možnosťou využitia plazmidov pri klonovaní a expresii významných génov.

Octové baktérie - čeľaď *Acetobacteriaceae* sa oddávna využívajú v potravinárskom a biotechnologickom priemysle ako producenti významných látok, predovšetkým kyseliny octovej, glukónovej, propiónovej a ďalších organických kyselín. Octové baktérie sú predstaviteľmi skupiny gram-negatívnych striktno aeróbných baktérií s tromi základnými rodmi: *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Frateuria* [1,2,3].

Mnohí zástupcovia rodu *Acetobacter* sú schopní syntetizovať vysokočisté polysacharidy, medzi ktoré patrí napr. celulóza syntetizovaná baktériou *Acetobacter xylinum*, ako aj rad ďalších priemyselne využiteľných produktov [4]. Naproti tomu premena D-sorbitolu na L-sorbózu pri syntéze vitamínu C je zase dominantnou vlastnosťou baktérií rodu *Gluconobacter*.

V súčasnosti sa octové baktérie stali významným objektom štúdia molekulovej biológie a genetiky so snahou využiť získané poznatky v moderných biotechnológiách. Štúdium je zamerané na objasnenie usporiadania a organizácie génov dôležitých metabolických dráh, úlohy restrikčno-modifikačného systému a funkcie extrachromozómových plazmidových DNA a ďalších genetických elementov.

---

Mgr. Vladimíra Bilská, Prírodovedecká fakulta UK, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

## Organizácia génov fermentácie kyseliny octovej u baktérií rodu *Acetobacter*

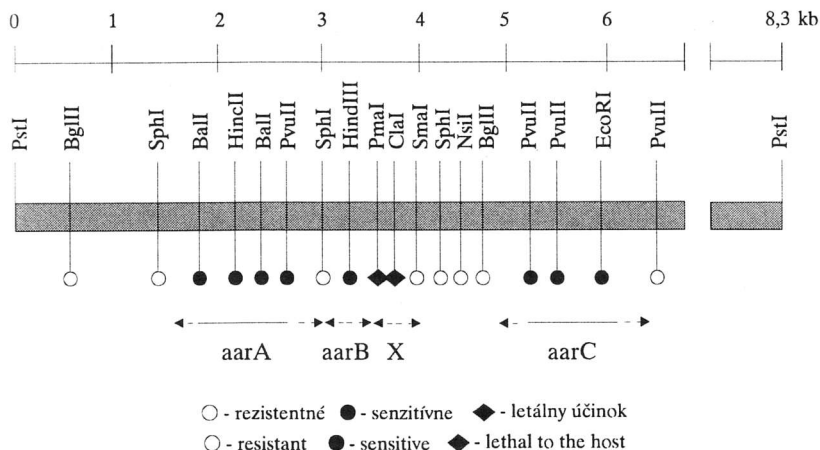
Produkcia kyseliny octovej je nepochybne jedna z najdôležitejších a aj najdlhšie využívaných schopností baktérií rodu *Acetobacter*. Pri raste na etanole u zástupcov rodu *Acetobacter* vzniká, za prítomnosti dvoch enzýmov octového kvasenia viazaných na bunkovú membránu alkoholdehydrogenázy (ADH) a aldehyddehydrogenázy (ALDH), kyselina octová. V bunkách je zároveň prítomný aj mechanizmus zabezpečujúci rezistenciu voči etanolu a kyseline octovej [5]. Enzým ADH bol študovaný u druhov *A. aceti*, *A. pasteurianus* a *A. polyoxogenes*. Tvorí komplex proteínových podjednotiek - katalytickej a cytochrómu c, pričom u niektorých druhov enzým obsahuje ešte navyše 15 kDa podjednotku neznámej funkcie [6]. Gény pre príslušné podjednotky sú organizované ako jeden operón. Aj u metylotropných baktérií (napr. *Acetobacter methanolicus*) sú gény kódujúce metanol-dehydrogenázu a cytochróm c usporiadané obdobným spôsobom [7]. Pri druhu *A. pasteurianus* sa v prítomnosti etanolu zvyšuje aktivita ADH asi desaťnásobne, pričom počet podjednotiek je rovnaký ako u etanolom neindukovaných buniek. Väčšina podjednotiek ADH je však lokalizovaná v bunkovej membráne. Ak sa etanol v prostredí nenachádza, je prevažná časť podjednotiek enzýmu lokalizovaná v cytoplazme [8]. Vysvetlením tohto javu je prítomnosť dvoch rozličných promótorov v ADH operóne, ktoré zabezpečujú syntézu enzýmov s odlišnou afinitou k bunkovej membráne či cytoplazme [9].

Aldehyddehydrogenáza je tvorená dvoma podjednotkami a nevykazuje žiadnu štruktúrnu homológiu s enzýmom ADH [10].

### Rezistencia voči kyseline octovej a etanolu

Dôležitými faktormi fermentačnej aktivity octových baktérií sú rezistencia na kyselinu octovú a etanol. Mechanizmus rezistencie na kyselinu octovú bol študovaný u mutantov senzitívnych na kyselinu octovú druhu *A. aceti* No. 1023. Gény zodpovedné za túto rezistenciu sú organizované v operóne s veľkosťou 8,3 kb. Inzerciou HaeII fragmentov génu kanamycínovej rezistencie do oblasti príslušného operónu sa ukázalo, že rozhodujúcu úlohu majú gény *aarA*, *aarB* a *aarC* (obr. 1.). Gén *aarA* má vysokú homológiu s génom pre citrát-syntetázu u *E. coli* a iných baktérií [11,12,13] a *aarC* gén je homologický s génom *acu-8*, ktorý je zahrnutý v utilizácii acetátu u *Neurospora crassa* [14]. 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.



OBR. 1. Restrikčná mapa operónu zodpovedného za rezistenciu na kyselinu octovú druhu *A. aceti* No. 1023 a účinok integrácie *HaeII* fragmentov *Km<sup>r</sup>* génu z plazmidu pACYC177 do buniek rezistentných na kyselinu octovú. Prerušenie príslušných génov nemusí mať efekt na hostiteľa (bunky zostávajú rezistentné na kyselinu octovú) alebo následkom integrácie sa bunky stávajú senzitivné na kyselinu octovú. V niektorých prípadoch má integrácia letálny účinok na hostiteľa.

FIG. 1. Restriction map of region of *Acetobacter aceti* No. 1023 DNA responsible for acetic acid resistance and the effect of integration of *HaeII* fragments harboring *Km<sup>r</sup>* gene, derived from pACYC177, on acetic acid resistance host. Interruption of responsible genes may have no effect to the host cells (the cells keep the acetic acid resistance), or the cells become acetic acid sensitive due to integration. In some cases, the integration is lethal to the host.

## Aspekty genetickej stability octových baktérií v biotechnologickom procese

V praxi je schopnosť oxidácie etanolu jednou z najdôležitejších vlastností čeľade *Acetobacteriaceae*. Spontánne mutácie v procese fermentácie a následná zmena fenotypu vedú ku genetickej nestabilite baktérií. Bunky veľmi ľahko strácajú a naopak rýchlo získavajú nový fenotyp. Spontánne strácajú schopnosť oxidácie etanolu a acetónu a naopak rýchlo získavajú schopnosť produkcie glukonátu, ketoglukonátu, dihydroxyacetónu a tvorby pigmentov. Sú schopné stratiť katalázovú aktivitu, menia morfológiu kolónií - teda vlastnosti, ktoré sú základom pre ich taxonomické zaradenie [15].

Vývojom nových metód génových manipulácií je možné ľahko identifikovať gény a sledovať zmeny vzniknuté mutáciou. Na génoch zabezpečujúcich oxidáciu etanolu v bunkách *Acetobacter* sa sledoval základný mechanizmus spontánnej mutácie, pri ktorej dochádza k strate schopnosti samotnej oxidácie. *U.A. acetii* a *A. pasteurianus* sa vyskytli s vysokou frekvenciou mutanty senzitivné voči kyseline octovej, pričom väčšina z nich stratila schopnosť

oxidácie etanolu [16,17]. Uvedené pozorovania naznačujú možný vplyv aktivity dehydrogenáz na jeden z mechanizmov rezistencie voči kyseline octovej. Molekulovo-biologické štúdium objasnilo, že genetická nestabilita schopnosti oxidovať etanol a rezistencie na kyselinu octovú u mnohých baktérií je zapríčinená inzerciou sekvencie IS1380 (1655 bp) do špecifickej oblasti génu pre cytochróm c. Hybridizácia podľa Southerna ukázala, že mnoho kmeňov rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Frateuria* obsahuje podobné sekvencie homologické s IS1380. Napríklad u *A. xylinum* zapríčiňujú transpozície IS1031 elementami stratu schopnosti syntetizovať celulózu [18,19].

### Štúdium celulóзовého operónu *Acetobacter xylinum*

Syntéza celulózy u *A. xylinum* prebieha jednoduchou polymerizáciou uridíndifosfoglukózy (UDPG), katalyzovanou enzýmom celulózasyntetáza. Operón pre syntézu celulózy je tvorený 4 génmi (*bcsABCD*). *BcsA* a *bcsB* génové produkty sa zúčastňujú polymerizácie glukózových zvyškov, *bcsC* gén je potrebný pre syntézu (1,4)-glukánu *in vivo*, ale nie *in vitro*. Nedostatok *bcsD* génového produktu zapríčiňuje 40 %-nú redukciu množstva nasyntetizovanej celulózy *in vivo* [20]. Purifikovaná celulózasyntetáza z kmeňa *A. xylinum* 1306-21 bola tvorená tromi hlavnými polypeptidmi s molekulovými hmotnosťami 90, 67 a 54 kDa [21]. 90 kDa polypeptid je kódovaný *bcsB* génom a jeho štiepením vzniká 67 kDa polypeptid, ktorý má funkciu katalytickej podjednotky. 80 kDa polypeptid predstavuje substrát viažucu doménu [22].

Standal a kol. [23] inzerciou IS1031A do oblasti operónu *bcs* kmeňa *A. xylinum* ATCC 23769 identifikovali ďalší gén nevyhnutný pre syntézu celulózy *in vivo*. *A. xylinum* obsahuje niekoľko inzerčných sekvencií vytvárajúcich IS1031 rodinu. Transpozície IS1031 elementami boli spojené so stratou schopnosti syntetizovať celulózu u spontánných mutantov *A. xylinum* ATCC 23769 [18,19]. Jeden z týchto mutantov obsahoval IS1031 inzerciu asi 500 bp pred génom *bcsA* *bcs* operónu *A. xylinum*. Presná funkcia tohto génu nie je známa, ale je jasné, že biosyntéza celulózy vyžaduje okrem polymerizačnej reakcie i ďalšie funkcie ako napr. transport z miesta polymerizácie do bunkovej membrány a do extracelulárneho priestoru, reguláciu génovej expresie, organizáciu procesu kryštalizácie a pod.

### Restrikčno-modifikačný systém octových baktérií

Restrikčno-modifikačný systém predstavuje účinnú obranu bunky voči cudzorodej DNA, ktorá keďže nie je modifikovaná vlastnými metylázami, stáva sa cieľom pre bunkové restrikčné enzýmy. Prítomnosť restrikčno-modifikačného systému môže byť prekážkou pri procese tvorby rekombinantných DNA. Úspešnosť závisí od výberu vhodného kmeňa, ktorý neobsahuje re-

TABULKA 1. Prehľad restričných endonukleáz produkovaných zástupcami rodu *Acetobacter*.  
TABLE 1. Review of restriction endonucleases produced by *Acetobacter* strains.

Enzým <sup>1</sup>	Sekvencia <sup>2</sup>	Izoschizomér <sup>3</sup>	Kmeň <sup>4</sup>
AatI	AGG↓CCT		<i>Acetobacter aceti</i> IFO 3281
AxyI	CC↓TNAGG		<i>Acetobacter xylinum</i> IFO 3288
AaaI	C↓GGCCG'	XmaIII, Eco521	<i>Acetobacter aceti</i> ss <i>aceti</i>
apaLI	G↓TGCAC	Alw44I, SnaI, VneI	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 13753
AliAJI	CTGCA↓G		<i>Acetobacter liquefaciens</i> AJ 2881
ApaI	GGGCC↓C		<i>Acetobacter pasteurianus</i> sub. <i>pasteurianus</i>
AorI	CC↓NGG		<i>Acetobacter aceti</i> sub. <i>orleanensis</i> NCIB 8622
ApaORI	CC↓NGG		<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 13752
ApaBI	GCANNNNN↓TGC		<i>Acetobacter pasteurianus</i> 3612
ApaCI	G↓GATCC	BamHI	<i>Acetobacter pasteurianus</i> 3614

1 - enzyme, 2 - sequence, 3 - isoschizomer, 4 - strain.

strično-modifikačný systém, alebo je možná príprava kmeňa deaktiváciou génov prítomného restrično-modifikačného systému. Na druhej strane, schopnosť restrično-modifikačných enzýmov, predovšetkým restričných endonukleáz špecificky štiepiť DNA našlo uplatnenie v technikách rekombinantných DNA. S rozvojom restričných endonukleáz v osemdesiatych rokoch boli niektoré druhy rodu *Acetobacter* popísané ako producenti restričných endonukleáz. Prvou restričnou endonukleázou purifikovanou z buniek *Acetobacter pasteurianus* bola restričná endonukleáza ApaI [24], ktorá rozpoznáva palindromatickú sekvenciu 5'-GGGCC↓C-3' pričom po štiepení zanecháva 3'-prečnievajúce konce. Naproti tomu restričná endonukleáza ApaLI [25] tiež z buniek *Acetobacter pasteurianus* štiepi dvojvláknovú DNA na 5'-konci v mieste nukleotidovej sekvencie 5'-G↓TGCAC-3'. Do skupiny významných restričných endonukleáz patrí aj ApaBI z *A. pasteurianus*, ktorá rozpoznáva oktonukleotidovú sekvenciu 5'-GCANNNNN↓TGC-3' a je vhodná pre analýzu veľkých úsekov DNA [26,27]. V bunkách *Acetobacter pasteurianus* boli popísané aj ďalšie restričné endonukleázy napr. ApaCI [28, 29], ApaDI [27] a ďalšie, ktoré sú prevažne iba izoschizomérne enzýmy so známymi a skôr izolovanými enzýmami iných baktérií (tab. 1.).

## Plazmidové vybavenie octových baktérií

Väčšina druhov octových baktérií obsahuje vo svojich bunkách veľké množstvo plazmidov, ktorých veľkosť sa pohybuje od kilobázy až po niekoľko

desiatok kilobáz. Výskyt plazmidov v základných kmeňoch rodu *Acetobacter* je znázornený v tabuľke 2. Prekvapením je, že u rodu *Acetobacter* na rozdiel od buniek *E. coli* je v jednej bunke až niekoľko plazmidov s rozdielnou molekulovou hmotnosťou [30-38]. Viac ako 90 % izolovaných plazmidov je z buniek schopných octového kvasenia. Takisto aj z buniek, ktoré sú schopné syntézy celulózy [39] a oxidácie glukózy boli izolované niektoré plazmidy. Zatiaľ nie je celkom objasnený vzťah prítomnosti plazmidov k procesom syntézy celulózy a oxidácie glukózy a ďalším metabolickým pochodom a funkciami v bunke.

Tak ako sa prirodzené plazmidy z buniek *E. coli*, *Bacillus subtilis* a ďalších bakteriálnych druhov využili pri konštrukcii klonovacích vektorov, aj plazmidy octových baktérií sa stali základom nových klonovacích vektorov. Jedným z prvých plazmidov, ktoré sa využili na konštrukciu klonovacích vektorov pre acetobactery boli dva kryptické plazmidy pTA5001A (23,5 kB) a pTA5001B (23 kb) izolované z *Acetobacter aceti* No. 1023 [33]. Kombináciou so známym plazmidom z buniek *E. coli* pACYC177 (Ap<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>) bol vytvorený prvý dvoj-funkčný vektor pre klonovanie jednak v bunkách *Acetobacter* ako aj bunkách *E. coli*. Počet kópií nového klonovacieho vektora na bunku *Acetobacter* bol stanovený na 1-3. Podobným spôsobom boli konštruované aj ďalšie vektory z plazmidu pMV102 (s veľkosťou 2,3 kb s počtom kópií okolo 15 na chromozóm) v kombinácii s rôznymi plazmidmi vhodnými pre klonovanie v bunkách *E. coli* [40]. Gény antibiotikových rezistencií na ampicilín, kanamycín, tetracyklín a chloramfenikol kódovaných na nových vektoroch sa úspešne exprimovali po vnesení do buniek *Acetobacter*. Väčšina z vektorov bola v oboch bunkách vysoko stabilná. Zo základného plazmidu pTA5001A a pMV102 boli konštruované klonovacie vektory pNK7 [41], pMV24 a pMVC1 [42], ktoré boli neskôr použité na klonovanie  $\beta$ -izopropylmalátdehydrogenázového génu (*leuB*) a rekombinantným plazmidom boli transformované bunky *A. aceti* No. 1023. Rekombinanty v hostiteľskom kmeni *Acetobacter aceti leu* boli selektované na prítomnosť *leu*<sup>+</sup> génu [33].

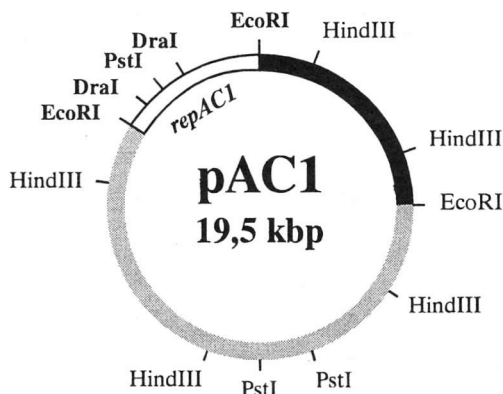
V bunkách *Acetobacter pasteurianus* 3614A bol popísaný a identifikovaný plazmid pAC1, ktorého veľkosť na základe skonštruovanej čiastočnej fyzikálnej mapy a elektrónmikroskopických snímok bola určená na 18,5 až 19 kb [43] (obr. 2.).

Na rozdiel od predchádzajúcich pripravených klonovacích vektorov s dvoma replikónmi bol z plazmidu pAC1 izolovaný replikón, ktorý bol použitý na konštrukcie klonovacích vektorov nielen pre octové baktérie, ale aj pre mnohé gram-negatívne baktérie. Plazmid je štiepitelný restriktívnymi endonukleázami EcoRI, PstI, PvuII a HindIII. Spojením EcoRI fragmentu, ktorý nesie replikón a fragmentu z vektora pUC4-KAPA s kanamycínovou rezistenciou sa skonštruovala séria vektorov pACK5, pACK9, pACK12, pACK20, pACK51 [26].

TABULKA 2. Distribúcia plazmidov v rôznych druhoch rodu *Acetobacter*.  
TABLE 2. Distribution of DNA plasmids in individual strains of *Acetobacter* genera.

Kmeň <sup>1</sup>		Počet plazmidov na bunku <sup>2</sup>	Molekulová hmotnosť plazmidov <sup>3</sup> [10 <sup>6</sup> g.mol <sup>-1</sup> ]
<i>A. aceti</i>	IFO 3281	6	1,8; 2,5; 3,3; 5,1; 17; >17
<i>A. aceti</i>	IFO 3283	3	1,1; 2,0; 2,1
<i>A. aceti</i>	IFO 3284	4	1,1; 1,5; 2,0; 2,1
<i>A. aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	ATCC 15973	2	1,9; 3,2
<i>A. aceti</i> subsp. <i>xylinum</i>	ATCC 10245	1	>17
<i>A. acetigenus</i>	IFO 3280	5	1,3; 2,5; 3,9; 7,0; 16
<i>A. acetosus</i>	IFO 3129	3	4,0; 4,2; >17
<i>A. acetosus</i>	IFO 3170	5	1,2; 1,3; 2,6; 4,7; 5,6
<i>A. acetosus</i>	IAM 1804	3	6,5; 8,6; 15
<i>A. albuminosus</i>	IAM 1807	1	14
<i>A. ascendens</i>	IFO 3188	2	1,4; 13
<i>A. ascendens</i>	IFO 3299	1	1,4
<i>A. aurantius</i>	IFO 3248	2	2,2; 4,1
<i>A. aurantius</i>	IFO 13333	2	>17, >17
<i>A. kuetingianus</i>	IFO 3222	2	2,8; 17
<i>A. pasteurianus</i>	IFO 3223	8	0,9; 1,0; 2,0; 2,5; 2,6; 3,6; >17; >17
<i>A. pasteurianus</i>	ATCC 33443	1	19
<i>A. pasteurianus</i>	ATCC 7839	3	1,5; 3,5; 7,5
<i>A. pasteurianus</i>	IAM 12073	3	1,7; 1,7; 1,8
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>estumensis</i>	IFO 13751	2	6,5; 10
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>lavaniensis</i>	IFO 13753	3	1,0; 11; >17
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>paradoxus</i>	IFO 13754	2	1,9; 4,3
<i>A. rancens</i>	IFO 3191	5	1,0; 1,6; 2,4; 4,2; 8,0
<i>A. rancens</i>	IFO 3297	4	1,1; 1,6; 2,0; 2,1
<i>A. rancens</i>	IFO 3298	6	1,1; 1,6; 2,0; 2,1; 4,1; >17
<i>A. rancens</i>	IAM 1826	3	17; >17; >17
<i>A. turbidans</i>	IFO 3225	8	0,9; 1,0; 2,5; 3,2; 5,2; 13; 17; >17
<i>A. xylinum</i>	IFO 3288	5	0,9; 1,4; 2,6; 2,9; >17
<i>A. xylinum</i>	IFO 13693	3	1,7; 4,6; 12

1 - strain, 2 - number of plasmids per cell, 3 - molecular weight of plasmids.



OBR. 2. Čiastočná fyzikálna mapa kryptického plazmidu pAC1 z buniek *Acetobacter pasteurianus* 3612A.

FIG. 2. Partial physical map of cryptic plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus* 3612A.

Podobne fragment s replikónom AC1 sa spojil s génom rezistencie na tetracyklín z plazmidu pBR322 a pripravil sa základný klonovací vektor pACT7 [44,45].

Všetky doteraz uvedené plazmidy s replikónom AC1 sú schopné replikácie jednak v bunkách *E. coli* ako aj v bunkách *A. pasteurianus* a ich stabilita počas dlhodobej kultivácie v neselektívnych podmienkach nadobúda hodnoty 98 až 100 %. Plazmidy sa v bunke vyskytujú vo viac ako 30 kópiách na chromozóm. Do pripravených vektorov bola klonovaná bakteriálna  $\beta$ -galaktozidáza a bola študovaná jej sekrécia cez bunkovú membránu z buniek *A. pasteurianus* 3614A [46].

V posledných rokoch sa sústreďuje pozornosť na využitie iných hostiteľov ako *E. coli* pri vývoji expresných systémov. Z hľadiska využitia rôznych rekombinantných produktov je dôležité, aby hostiteľský organizmus, v ktorom expresia prebieha, bol pre človeka nepatogénny. Octové baktérie, nepatogénne a pomerne dlho využívané organizmy v potravinárskom priemysle, sú jedny z významných kandidátov. *Acetobacter methanolicus* bol využitý na expresiu génu pre nukleokapsidový antigén vírusu hepatitídy B. Možnosť expresie virálnych génov v mikroorganizmoch je zvlášť výhodná v prípade, ak je náročná kultivácia vírusu v ľudských alebo živočíšnych bunkových líniiach.

## Literatúra

1. DE LEY, J. - GRILIS, M. - SWINGS, J.: Family *Acetobacteriaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Krieg, N. R. - Holt J. G. Baltimore, Williams and Wilkins 1984, s. 275-275.



2. DE LEY, J. - SWINGS, J. - GOSSALÉ, F.: Genus *Acetobacter*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Krieg, N. R. - Holt J. G. Baltimore, Williams and Wilkins 1984, s. 268-274.
3. SWINGS, J. - DE LEY, J. - HOLT, J. G.: Genus *Frateriura*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Krieg, N. R. - Holt J. G. Baltimore, Williams and Wilkins 1984, s. 210-213
4. CANNON, R. E. - ANDERSON, S. M.: Biogenesis of bacterial cellulose. Crit. Rev. Microbiol., 17, 1991, s. 435-447.
5. AMEYAMA, M. - ADACHI, O.: Alcohol dehydrogenase from acetate acid bacteria, membrane-bound. Meth. Enzymol., 89, 1992, s. 450-457.
6. MATSUSHITA, K. - TAKAKI, Y. - SHINAGAWA, E. - AMEYAMA, M. - ADACHI, O.: Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria. Reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 1992, s. 304-310.
7. HARNS, N. - DE VRIES, G. E. - MAURER, K. - HOOGENDIJK, J. - STOUTHAMER, A. H.: Isolation and nucleotide sequence of the methanol dehydrogenase structural gene from *Paracoccus denitrificans*. J. Bact., 169, 1987, s. 3969-3975.
8. TAKEMURA, H. - KONDO, K. - HORINOUCI, S. - BEPPU, T.: Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase gene from *Acetobacter polyoxogenes*. J. Bact., 175, 1993, s. 6857-6866.
9. BEPPU, T.: Genetic organisation of *Acetobacter* for acetic acid fermentation. Antonie van Leeuwenhoek, 64, 1993, s. 121-135.
10. TAMAKI, T. - HORINOUCI, S. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAVAMURA Y. - BEPPU, T.: Nucleotide sequence of the membrane bound aldehyde dehydrogenase gene from *Acetobacter polyoxogenes*. Biochim. biophys. Acta, 1088, 1989, s. 292-300.
11. NER, S. S. - BHAYANA, V. - BELL, A. W. - GILES, I. G. - DUCKWORTH, H. W. - BLEKHAN, D. P.: Complete sequence of the *glcA* gene encoding citrate synthase in *Escherichia coli*. Biochemistry, 22, 1983, s. 5243-5249.
12. WOOD, D. D. - WILLIAMSON, L. R. - HERBERT, H. H. - KRAUSE, D. C.: Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. J. Bact., 169, 1987, s. 3564-3572.
13. DONALD, L. J. - MOLGAAT, G. F. - DUCKWORTH, H. W.: Cloning, sequencing and expression of the gene for NADH-sensitive citrate synthase of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact., 171, 1989, s. 5542-5550.
14. MARATHE, S. - CONNERTON, I. F. - FINCHAM, J. R.: Duplication-induced mutation of a new *Neurospora* gene required for acetate utilization: properties of the mutant and predicted amino acid sequence of the protein product. Molec. cell. Biol., 10, 1990, s. 2638-2644.
15. SWING, J.: The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Vol. 3. Ed. Balows, A. - Truper, H. G. - Dworkin, M. - Harder, W. - Schleifer, K. H. New York, Springer-Verlag 1992, s. 2268-2286.
16. OHMORI, S. - MASAI, H. - ARIMA, K. - BEPPU, T.: Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. Agric. biol. Chem., 44, 1980, s. 2901-2906.
17. TAKEMURA, H. - HORINOUCI, S. - BEPPU, T.: Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. J. Bact., 173, 1991, s. 7070-7076.
18. COUCHERON, D. H.: An *Acetobacter xylinum* insertion sequence elements associated with inactivation of cellulose production. J. Bact., 173, 1991, s. 5723-5731.
19. COUCHERON, D. H.: A family of IS1031 elements in the genome of *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequence and strain distribution. Molec. Microbiol., 9, 1993, s. 211-218.
20. WONG, H. C. - FEAR, A. L. - CALHOON, R. D. - EICHINGER, G. H. - MAYER, R. - ROSS, P. - BENZIMAN, M. - BEN BASSAT, A. - TAL, R.: Genetic organisation and regulation of the cellulase operon in *Acetobacter xylinum*. Proc. nat. Acad. Sci. USA, 87, 1990, s. 8130-8134.

21. MAYER, R. - ROSS, P. - WEINHOUSE, H. - AMIKAM, D. - VOLMAN, G. - OHANA, P. - CALHOON, R. D. - WONG, H. C. - EMERICK, A. W. - BENZIMAN, M.: Polypeptide composition of bacterial cycle diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting protein in higher plant. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 5472-5476.
22. LIN, F. C. - BROWN, R. M. JR. - DRAKE, R. R. JR. - HALEY, B. E.: Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-glc) binding subunit of cellulase synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-glc. *J. biol. Chem.*, 265, 1990, s. 4782-4784.
23. STANDAL, R. - IVERSEN, T. - PEDERSEN, T. - COUCHERON, D. H.: IS1032 from *Acetobacter xylinum*, a new mobile insertion sequence. *Plasmid*, 32, 1994, s. 46-54.
24. SEURINCK, J. - VAN DE VOORDE, A. - VAN MONTAGU, M.: A new restriction endonuclease from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res.*, 11, 1983, s. 4409-4415.
25. YAMADA, Y. - MURAKAMI, M.: Restriction endonucleases in acetic acid bacteria. Part IV. Purification, properties and recognition sequence of site-specific restriction endonuclease from *Gluconobacter cerinus* IFO 3285. *Agric. biol. Chem.*, 49, 1985, s. 3627-3629.
26. GRONES, J. - ŠKERENOVÁ, M. - TURŇA, J.: Preparation of recombinant plasmids with kanamycin resistance in plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biológia (Bratislava)*, 46, 1991, s. 673-678.
27. GRONES, J. - TURŇA, J.: Some properties of restriction endonuclease ApaBI from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochim. biophys. Acta*, 1162, 1993, s. 323-325.
28. GRONES, J. - TURŇA, J.: ApaCI, an isoschizomer of BamHI isolated from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1992a, s. 3513.
29. GRONES, J. - TURŇA, J.: Isolation of a new restriction enzyme, ApaCI, an isoschizomer of BamHI by *Acetobacter pasteurianus*. *Folia microbiol. (Praha)*, 37, 1992, s. 353-356.
30. OHMORI, S. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability an *Acetobacter* strain. *Agric. biol. Chem.*, 46, 1982, s. 381-389.
31. MASUDA, M. - KAWASAKI, H. - TONOMURA, K.: Plasmid in *Gluconobacter*. *Hakkokugaku*, 61, 1983, s. 15-18.
32. INOUE, T. - FUKUDA, M. - YANO, K.: Efficient introduction of vector plasmids into acetic acid bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 63, 1985, s. 1-4.
33. OKUMURA, H. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: Construction of plasmid vectors and genetic transformation system for *Acetobacter aceti*. *Agric. biol. Chem.*, 49, 1985, s. 1011-1017.
34. TEUBER, M. - SIEVERS, M. - ANDRESEN, A.: Characterisation of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles. *Biotechnol. Lett.*, 9, 1987, s. 265-268.
35. FUJIWARA, M. - FUKUSHI, K. - TAKAI, M. - HAYASHI, J.: Construction of shuttle vectors and a genetic transformation system for cellulose producing bacteria: *Acetobacter xylinum*. In: *Cellulose*. Ed. Kenedy, J. F. - Phillips, G. O. - Williams, P. A. Chichester, Ellis Harwood Ltd. 1989, s. 2083-2090.
36. FUJIWARA, M. - FUKUSHI, K. - TAKAI, M. - HAYASHI, J. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y.: Construction of shuttle vectors derived from *Acetobacter xylinum* for cellulose producing bacterium *Acetobacter xylinum*. *Biotechnol. Lett.*, 14, 1992, s. 593-542.
37. GRONES, J. - TURŇA, J.: Some properties of restriction endonucleases from *Acetobacter pasteurianus*. *Biológia (Bratislava)*, 46, 1991, s. 1103-1108.
38. TAKEDA, Y. - SHIMIZI, T.: Expression of cytochrome *c*-553 (CO) gene that complements the second subunit deficiency of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans* subsp.  $\alpha$ . *J. Ferment. Bioengng*, 73, 1992, s. 89-93.
39. VALLA, S. - CAUCHERON, D. H. - KJOSBAKKEN, J.: The plasmids of *Acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. *Molec. gen. Genet.*, 208, 1987, s. 76-83.

40. FUKAYA, M. - OKUMURA, T. - MASAI, H. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: Construction of new shuttle vector for *Acetobacter*. Agric. biol. Chem., 49, 1985, s. 2083-2090.
41. TAMAKI, T. - FUKAYA, M. - TAKEMURA, H. - TAYAMA, K. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y. - NISHIYAMA, M. - HORINOUCI, S. - BEPPU, T.: Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. Biochim. biophys. Acta, 1088, 1991, s. 292-300.
42. FUKAYA, M. - TAKEMURA, H. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y. - HORINOUCI, S. - BEPPU, T.: Cloning of gene responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. J. Bact., 172, 1990, s. 2096-2104.
43. GRONES, J. - ŠKERENOVÁ, M. - BEDERKOVÁ, K. - TURŇA, J.: Isolation and characterisation of plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. Biológia (Bratislava), 44, 1989, 12, s. 1181-1186.
44. GRONES, J. - TURŇA, J.: Construction of shuttle vectors for cloning in *Escherichia coli* and *Acetobacter pasteurianus*. Folia microbiol. (Praha), 37, 1992, s. 395-400.
45. GRONES, J. - TURŇA, J.: Characterisation of replicon from pAC1 plasmid from *Acetobacter pasteurianus*. Biochem. biophys. Res. Commun., 191, 1993, s. 26-31.
46. GRONES, J. - BENCOVÁ, K.: Cloning, production and secretion of  $\beta$ -galactosidase in *Acetobacter pasteurianus*. Folia microbiol. (Praha), 39, 1994, s. 99-104.

Do redakcie došlo 1.10.1996.

### **Industrial use of acetic acid bacteria and characterization of the genes responsible for production of biotechnologically significant products**

VLADIMÍRA BILSKÁ

SUMMARY. Acetic acid bacteria are widely used on an industrial scale, especially in food and biotechnology industries. Study of important genes, restriction-modification system and various genetic elements of acetic acid bacteria could lead to understanding of a genetic background of the industrially significant species. The genes which encode proteins are involved in production of important compounds, e.g. acetic acid and cellulose, play an essential role. Regarding the actual technologies, it is necessary to throw light upon a role of the acetic bacteria restriction-modification system, the genetic stability of cells in industrial processes, and the presence of extrachromosomal DNA plasmids, that can be used at cloning and expression of significant genes.