

УДК 579.222

АНАЛИЗ ГЕНОМА И РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ДЕГРАДАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕТАИНА У ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *ANOXYNATRUM SIBIRICUM*¹

© 2024 г. Е. Н. Деткова^а, Ю. В. Болтянская^а, Н. В. Пименов^а,
А. В. Марданов^б, В. В. Кевбрин^{а, *}

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Москва, 119071, Россия

^бИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Москва, 119071, Россия

*e-mail: kevbryn@inmi.ru

Поступила в редакцию 27.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Проведен анализ генома галоалкалофильного анаэробного микроорганизма *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^Т, выделенного ранее из содового озера Нижнее Белое (Республика Бурятия, Россия). Выявлена способность организма к использованию бетаина в качестве акцептора электронов в реакции Стикланда. Внесение бетаина в среду не только оказывало стимулирующее действие на рост на аминокислотах, использующихся *A. sibiricum* индивидуально, но и позволило выявить дополнительные аминокислоты, рост на которых не был возможен без акцептора. На основании геномных характеристик и экспериментальных ростовых данных предложены метаболические схемы разложения аминокислот в присутствии и в отсутствие бетаина. Схемы для треонина, глутамата и лизина при их совместном использовании с бетаином составлены впервые. Для всех используемых аминокислот определены качественный и количественный состав продуктов обмена и получены стехиометрические соотношения субстрат/продукт. Составлены балансовые уравнения для выявленных вариантов реакции Стикланда, включая ранее не описанные в литературе.

Ключевые слова: бетаин, аминокислоты, реакция Стикланда, галоалкалофилы, содовые озера, бета-инредуктазный комплекс

DOI: 10.31857/S0026365624060038

Содовые озера широко распространены в природе и характеризуются тем, что, наряду с хлоридом, содержат в качестве доминирующего аниона карбонат, что приводит к повышенным значениям pH среды в таких экосистемах. Несмотря на экстремальные условия окружающей среды (высокие концентрации солей и pH), микрофлора в содовых водоемах весьма разнообразна и содержит представителей основных трофических групп микроорганизмов (Заварзин и соавт., 1999; Grant, Jones, 2016). Трофическая структура галоалкалофильного микробного сообщества содовых озер системно изучается в лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН с начала 1990-х годов (Zhilina, Zavarzin, 1994),

причем наибольшее внимание уделяется анаэробным микроорганизмам-деструкторам. Деструкция органического вещества является важнейшим процессом, определяющим существование биологического круговорота элементов в природе и обеспечивающим устойчивость биоценозов. При отмирании живых организмов высвобождается большое количество разнообразных органических соединений, которые в дальнейшем могут служить субстратами для роста микроорганизмов. Среди таких соединений в содовых водоемах можно отдельно отметить бетаин — вещество, являющееся широко распространенным осморегулятором у ряда галофильных бактерий и архей. В зависимости от солености среды, концентрация

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060038>

бетаина может достигать 16% от сухого веса клетки (Sorokin et al., 2008).

Исходя из литературных данных, а также из результатов собственных экспериментальных исследований, удалось установить, что в анаэробных условиях деградация бетаина происходит тремя различными способами:

1) Путем брожения. Среди микроорганизмов, осуществляющих этот процесс можно выделить экстремального галофила *Acetohalobium arabaticum* (Жилина, Заварзин, 1990), а также галоалкалофильные штаммы рода *Natroniella* spp. (Sorokin, 2021).

2) Использованием в качестве субстрата и донора электронов в окислительно-восстановительной реакции. К такой реакции способны, например, морские виды *Desulfobacterium* (Heijthuisen, Hansen, 1989). Среди галоалкалофилов известна архея *Halalkaliarchaeum* spp., которая осуществляет окисление бетаина с сульфатом как акцептором электронов (Sorokin, 2021).

3) Использованием в качестве акцептора электронов в паре с различными донорами: аминокислотами (реакция Стикланда) и олигопептидами, а также с формиатом, водородом и другими ключевыми для микробного сообщества метаболитами. Роль бетаина как акцептора электронов была впервые продемонстрирована для негалофильного анаэроба *Clostridium sporogenes* (Naumann et al., 1983), а позднее для галофилов *Haloanaerobacter salinarum* (Mouné et al., 1999) и *Halanaerobacter lacunarius* (ранее *Halobacteroides lacunaris*) (La Cono et al., 2015). В условиях высокой карбонатной щелочности реакция Стикланда с бетаином впервые была показана для галоалкалофила *Halonatronomonas betaini*, выделенного из содового озера Танатар III (Деткова и соавт., 2022). В качестве доноров электронов бактерия использовала олигопептиды — дрожжевой экстракт, триптон, пептон, сойтон, а также аминокислоты — лейцин, аланин, валин, изолейцин и серин. Данный процесс имеет значение с точки зрения не только понимания путей деградации бетаина, но и способов утилизации аминокислот в алкалофильном микробном сообществе, где свободные аминокислоты могут поступать в микроокружение в результате деструкции белков после отмирания и распада живых клеток.

Целью данной работы было оценить способность галоалкалофильных анаэробных микроорганизмов из коллекции лаборатории реликтовых микробных сообществ к деградации бетаина в реакции Стикланда в условиях повышенных солености и карбонатной щелочности, секвенировать и проанализировать геном выбранного модельного организма *Anoxynatronum sibiricum* и выявить возможные метаболические пути разложения аминокислот как в присутствии бетаина, так и без него, исходя из геномных характеристик и экспериментальных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организмы и культивирование. Объектами предварительного исследования служили 23 галоалкалофильных микроорганизма из коллекции лаборатории. Для выращивания культур, отобранных по их способности к использованию бетаина (*Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T, *Alkaliphilus peptidifermentans* Z-7036^T и *Natronincola peptidivorans* Z-7031^T), использовали минеральную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0.2; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; NH_4Cl — 0.5; KCl — 0.2; NaCl — 5.0; Na_2CO_3 — 3.0; NaHCO_3 — 12.0; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; дрожжевой экстракт — 0.2; раствор микроэлементов — 1 мл/л; раствор витаминов — 10 мл/л, pH 9.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 556; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 119; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 197; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 99; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 144; H_3BO_3 — 31; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ — 237; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 24; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 33; Na_2SeO_3 — 17; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 17. Раствор витаминов имел следующий состав (мг/л): биотин — 10; фолиевая кислота — 10; тиоктовая кислота — 10; пиридоксин гидрохлорид — 10; тиамин гидрохлорид — 20; рибофлавин — 20; никотиновая кислота — 10; Ca-D-пантотенат — 20; цианокобаламин — 25; p-аминобензойная кислота — 10. Организмы культивировали строго анаэробно при 35–37°C в пробирках Хангейта или флаконах объемом 120 и 500 мл.

Концентрации дрожжевого экстракта и аминокислот в предварительных опытах составляли 1.5 г/л. Раствор бетаина, предварительно нейтрализованный 12M NaOH, вносили в среды до конечной концентрации 3 г/л. В опытах по изучению катаболизма аминокислот в отсутствие и в присутствии бетаина их концентрации задавали, исходя из теоретических стехиометрических соотношений, указанных в работе (Деткова и соавт., 2022).

Засев осуществляли из расчета 1–3% (об./об.). В зависимости от используемой аминокислоты культуры инкубировали 1–1.5 мес. до максимального истощения субстрата и накопления продуктов метаболизма. Каждый эксперимент проводили не менее чем в трех независимых повторностях, полученные результаты усредняли.

Определение роста. За ростом культур следили по потреблению субстрата или, в случае опытов в пробирках Хангейта, по увеличению оптической плотности при 600 нм на спектрофотометре Unico 2100 (США).

Аналитические методы. Аминокислоты, бетаин, летучие жирные кислоты и аммоний определяли, как описано ранее (Деткова и соавт., 2022). Формиат и нелетучие органические кислоты определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия). Разделение проводили на колонке Aminex HPL-87 (“BioRad”, США) при 50°C

с 5 мМ Н₂SO₄ в качестве элюента. Колонка была подсоединена к спектрофотометрическому детектору с установленной длиной волны 210 нм.

Секвенирование и аннотация генома. Геномную ДНК из свежей культуры выделяли с помощью наборов DNeasy PowerSoil kit (“Qiagen”, Германия) по протоколам фирмы-производителя. Для приготовления геномной библиотеки использовали наборы NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (“New England Biolabs”, США). Полученную библиотеку секвенировали на MiSeq (“Illumina”, США) с использованием наборов MiSeq Regent Kit V3 (600 циклов). Всего было получено 2.2 млн. парных чтений, суммарная длина которых составляла 1.3 млрд. нуклеотидов. Парные пересекающиеся чтения были объединены с помощью программы FLASH v. 1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011), затем чтения с низким качеством были удалены с помощью программы Sickle v. 1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>). Сборку последовательностей осуществляли программой SPAdes v 3.15.4 (Vasilinets et al., 2015) с параметрами для изолятов. Поиск генов и аннотацию проводили с помощью вебсервиса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016). Поиск ферментов проводили с использованием вебсервиса BRENDA (Chang et al., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор объектов исследования

В результате скрининга коллекции не было обнаружено микроорганизмов, использующих бетаин в качестве единственного субстрата для роста и получения энергии (дополнительные материалы, табл. S1). Однако было выявлено три организма различных таксономических групп, рост которых на дрожжевом экстракте стимулировался бетаином. Количественные характеристики их роста в присутствии и в отсутствие бетаина показаны в табл. 1.

У всех этих штаммов среди продуктов был обнаружен триметиламин (данные не показаны), что доказывает использование бетаина как акцептора электронов. В качестве объекта дальнейших

исследований был выбран *A. sibiricum* Z-7981^T, выделенный из содового озера Нижнее Белое (Республика Бурятия, Россия) (Garnova et al., 2003), стимуляция для которого оказалась максимальной. Этот организм оказался единственным из трех вышеупомянутых, для которого до настоящего времени не было проведено полногеномного секвенирования.

Поскольку дрожжевой экстракт – сложный субстрат, включающий в себя смесь пептидов и индивидуальных аминокислот, и работа с ним не позволяет составлять балансовые уравнения и метаболические схемы, а также проводить некоторые аналитические определения, ключевыми модельными субстратами для наших целей стали аминокислоты. Так как необходимо различать сбраживание аминокислот и их окисление в паре с внешним акцептором электронов, необходимо было оценить способность к росту *A. sibiricum* на индивидуальных аминокислотах.

Основные характеристики генома *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T

С использованием платформы фирмы Illumina мы получили драфт-геном *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T. Микроорганизм имеет геном размером около 3.9 млн. нуклеотидных оснований. Содержание ГЦ пар в ДНК составляет 48.47%. В геноме содержится 10 оперонов рибосомных генов (16S–23S–5S), 3500 белок-кодирующих генов и 50 генов, кодирующих тРНК. Ближайшим доступным в GTDB геномом к рассматриваемому оказался геном *Anoxynatronum* sp. (*Clostridiaceae* bacterium, GCA_011390155.1) со средней идентичностью полного генома на нуклеотидном уровне (ANI) 91.73%, что соответствует отдельному виду. Геном *A. sibiricum* Z-7981^T депонирован в базе GenBank под номером JVCITM000000000.

Катаболическое использование аминокислот без бетаина

Ранее было показано, что *A. sibiricum* способен сбраживать глутамат и цистеин (Garnova et al., 2003). При тестировании всех 20 протеиногенных

Таблица 1. Влияние бетаина на рост культур

Микроорганизм	ΔОП ₆₀₀		Коэффициент стимуляции роста
	Дрожжевой экстракт	Дрожжевой экстракт + бетаин	
<i>Anoxynatronum sibiricum</i> Z-7981 ^T	0.07	0.23	3.3
<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> Z-7036 ^T	0.06	0.19	3.2
<i>Natronincola peptidivorans</i> Z-7031 ^T	0.05	0.15	3.0

Примечание. Символ Δ означает разницу между начальным и конечным значениями ОП. Коэффициент стимуляции роста рассчитан как частное от деления ΔОП в присутствии и в отсутствие бетаина.

Таблица 2. Сбраживание индивидуальных аминокислот *A. sibiricum* Z-7981^T

АК	Формиат	Ацетат	Пропионат	Бутират	ΔАК	Баланс по углероду, %	ΔNH ₃	ΔNH ₃ /ΔАК
Серин	3.9	9.7	0	0.8	9.7	92	11.7	1.2
Треонин	1.5	17.8	0.3	0	10.0	94	11.2	1.1
Аспартат	0.8	4.9	4.6	0	9.1	67	8.9	1.0
Глутамат	5.0	1.9	5.0	2.1	9.1	70	8.7	1.0
Лизин	1.6	9.2	0.4	3.4	6.5	89	12.2	1.9
Аргинин	1.7	11.8	2.0	1.5	7.6	81	14.5	1.9

Примечание. АК — аминокислота. Все концентрации даны в мМ.

аминокислот нами дополнительно был обнаружен рост на серине, треонине, лизине, аргинине и аспартате. Конечные продукты распада аминокислот, а также балансы по углероду показаны в табл. 2.

Основными продуктами сбраживания аминокислот являлись короткоцепочечные летучие жирные кислоты и аммиак. Рост на треонине сопровождался появлением в культуральной жидкости неидентифицированной нелетучей органической кислоты, отличной от лактата или сукцината. Состав летучих жирных кислот варьировал в зависимости от аминокислоты. В большинстве случаев основным продуктом был ацетат, в меньших количествах образовывались формиат, пропионат и бутират. Исключением оказался глутамат, при использовании которого преобладали формиат и пропионат. Кроме того, он оказался единственной аминокислотой, при сбраживании которой концентрация формиата превышала концентрацию ацетата. Заниженное значение углеродного баланса при росте на аспартате и глутамате было связано с образованием неучтенной углекислоты, количественное измерение которой невозможно в карбонатных средах. Баланс по углероду подтвержден тремя независимыми экспериментами.

Количества образовавшегося аммиака были пропорциональны количествам потребленной аминокислоты и соответствовали правилу — из одной аминогруппы образуется одна молекула аммиака. Таким образом, из одной молекулы серина, треонина, аспартата и глутамата образуется по одной молекуле аммиака, а из лизина — две. Исключением оказался аргинин, в случае которого из четырех атомов азота, входящих в состав молекулы, образовывалось только две молекулы аммиака. По-видимому, оставшиеся два атома азота переходят в мочевину, что согласуется с предполагаемой схемой катаболизма аргинина, построенной на основании геномных данных (см. ниже). Количественная оценка мочевины в карбонатных средах с высокими значениями рН невозможна из-за ее спонтанного образования из аммиака и углекислоты, поэтому из-за подвижного

химического равновесия разделить биогенную и абиогенную мочевину оказалось невозможным.

Нейтральные аминокислоты — треонин и серин. В геноме *A. sibiricum* Z-7981^T обнаружены гены, кодирующие ферменты всех четырех известных путей метаболизма треонина. Они включают треониндегидрогеназу, треонинальдолазу, треонинаммонийлиазу и треонинкиназу (рис. 1а).

Катаболическое разложение треонина у штамма инициируют треониндегидрогеназа и треонинальдолаза с образованием в качестве промежуточных продуктов, соответственно, только глицина (треониндегидрогеназный путь) или глицина в сочетании с ацетальдегидом (треонинальдолазный путь). Глицин трансформируется глицингидроксиметилтрансферазой в серин, который далее преобразуется через пируват в ацетат по известной схеме. Помимо классической L-серинаммонийлиазы, геном содержит также D-серинаммонийлиазу. При внесении D,L-серина функционируют оба вида лиазы, что подтверждается полным исчезновением аминокислоты-рацемата в конце роста. Превращение пирувата в ацетил-КоА является энергодающим и осуществляется посредством пируватсинтазы (*por*), сопряженной через ферредоксин с Rnf-комплексом, кодируемым опероном *rnfCDGEAB*. Геном штамма содержит Rnf-кластер второго типа, характерный для видов *Clostridium*, *Alkaliphilus*, *Thermanaerobacter* и *Ruminococcus* (Biegel et al., 2011). Похожим способом, возможно, протекает и окисление ацетальдегида до ацетата, так как геном содержит пять копий гена *aor*, кодирующего альдегид ферредоксин оксидоредуктазу.

Помимо ацетата среди продуктов брожения серина и треонина был обнаружен формиат, тогда как водород отсутствовал (табл. 2). Образование формиата вызывается, по-видимому, обратным действием формиатдегидрогеназы (ФДГ). В геноме штамма найдены гены, кодирующие три вида ФДГ — ферредоксин-связанную ФДГ (*fdhF2*, ЕС 1.17.1.11), ФДГ-О (*fdh-O*, ЕС 1.17.1.9) и F420-связанную ФДГ (ЕС 1.17.98.3). Подобно Rnf-комплексу, ферредоксин-связанная ФДГ относится к группе ферментных комплексов

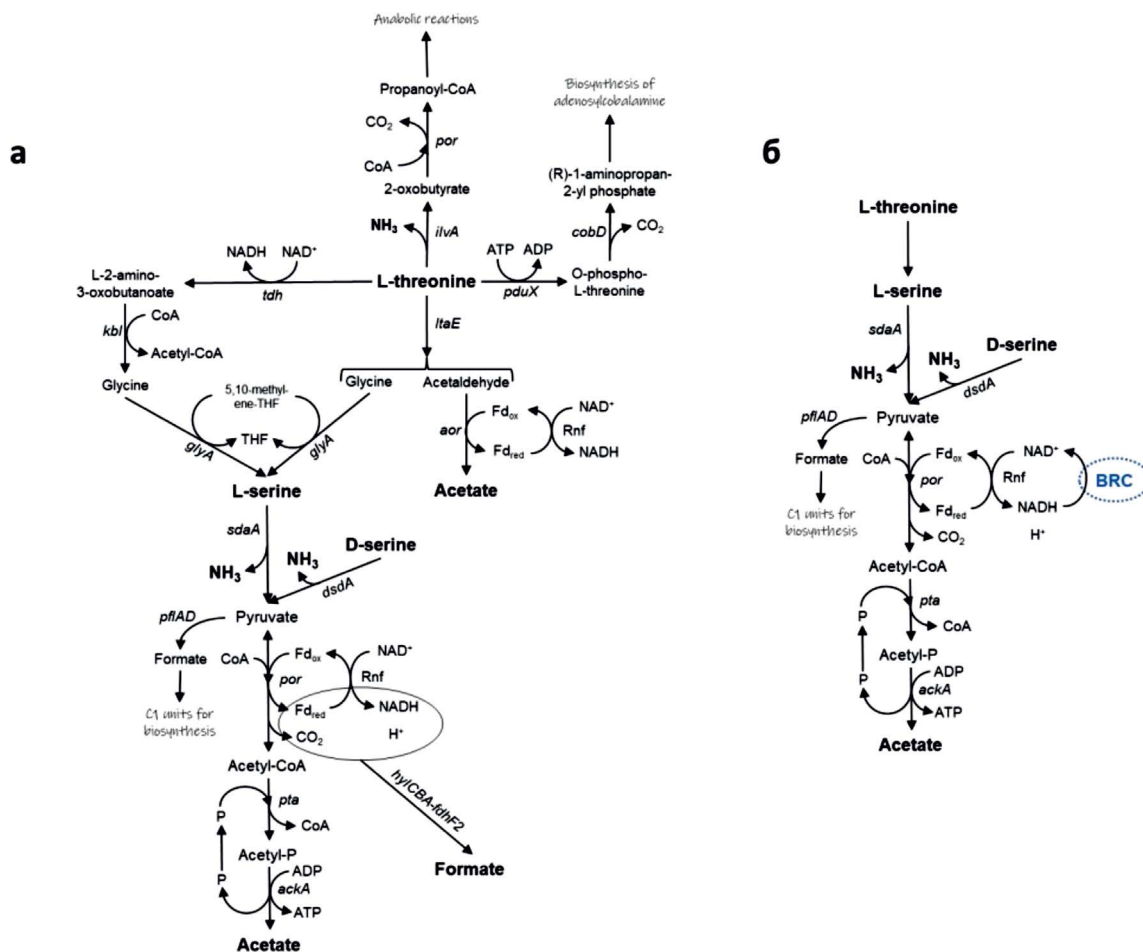


Рис. 1. Предлагаемая метаболическая схема разложения треонина и серина *A. sibiricum* Z-7981^T: а — без бетаина; б — с бетаином. BRC — бетаинредуктазный комплекс. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

с бифуркацией электронов, и, конкретно для ФДГ комплекса, отнесение его к этой группе было впервые показано у *Gottschalkia (Clostridium) acidurici*, где он кодируется генным кластером *hylCBA-fdhF2* (Wang et al., 2013). Из генов гидрогеназного комплекса, часто работающих в связке с ФДГ, в геноме имеется лишь *hndB*, возможно, поэтому *A. sibiricum* не образует водород. ФДГ-О работает как одна из ФДГ у *E. coli* и других аэробных и факультативно анаэробных организмов, где она отвечает за утилизацию формиата как донора электронов при анаэробном росте (Wang, Gunsalus, 2003). Сведения об участии ФДГ-О в образовании формиата в литературе отсутствуют. Анализ генома *A. sibiricum* не выявил ген, кодирующий коэнзим F420, однако на основе драфт-генома нельзя сделать однозначный вывод об отсутствии F420 и невозможности функционирования F420-связанной ФДГ.

A. sibiricum при росте на треонине образует только следовые количества пропионата (табл. 2).

При поиске генов, ответственных за превращение пропионил-КоА в пропионат (треонинаммонийлиазный путь), удалось выявить только ген *pct*, кодирующий пропионат-КоА-трансферазу (ЕС 2.8.3.1). Это характерный фермент акрилатного пути образования пропионата у некоторых пропионатобразующих клостридий (Hetzel et al., 2003), однако других ферментов этого пути у *A. sibiricum* не обнаружено. Значимые количества пропионата штамм Z-7981^T образует только при росте на аргинине, аспартате и глутамате (табл. 2). Механизмы такой регуляции неизвестны. Мы предполагаем, что при росте на треонине образующийся пропионил-КоА, возможно, идет на анаболические цели. Роль треонинкиназы, кодируемой *pduX*, также анаболическая. Показано ее участие в биосинтезе аденозилкобаламина (Fan, Bobik, 2008).

Кислые аминокислоты — глутамат и аспартат. Для разложения глутамата *A. sibiricum* Z-7981^T имеет

оба типа глутаматдегидрогеназ – NAD^+ - и NADP^+ -зависимые (рис. 2а).

Окисление образующегося 2-оксоглутарата до сукцинил-КоА, подобно пирувату, также сопряжено с Rnf-комплексом, но в данном случае найден четырехсубъединичный ферментный комплекс 2-оксоислоты ферредоксин оксидоредуктазы, кодируемый опероном *korDABC*. В геноме *A. sibiricum* Z-7981^T он представлен тремя копиями. Из пяти известных путей разложения глутамата (Buckel, 2001) геном штамма Z-7981^T имеет гены только 4-аминобутиратного пути, проходящего через сукцинил-КоА, сукцинат полуальдегид и далее до кротонил-КоА (рис. 2а), хотя и без вовлечения самого 4-аминобутирата. Все гены этого пути в геноме собраны в один кластер. Трансформация кротонил-КоА в бутирил-КоА осуществляется тетрамерным комплексом бутирил-КоА-дегидрогеназы с ФАД (EtfAB-Bcd), также сопряженной с Rnf-комплексом (Buckel, 2021). Совместная работа двух комплексов позволяет получить дополнительно по 0.5 моль АТФ на каждую молекулу затраченного кротонил-КоА. На конечной стадии из бутирил-КоА

образуется бутират по механизму, сходному с образованием ацетата из ацетил-КоА (рис. 1а). Бутиратный цикл (Buckel, 2021) у штамма Z-7981^T незамкнут, так как в геноме нет гена, кодирующего бутирил-КоА-трансферазу (ЕС 2.8.3.8). Остается неясным образование ацетата при росте на глутамате, поскольку часто встречающийся метиласпартатный путь образования ацетата у анаэробов, использующих глутамат (Buckel 2021), у штамма Z-7981^T отсутствует. Мы предполагаем, что часть образованного кротонил-КоА через ацетоацетил-КоА идет на образование ацетата в процессе, обратном образованию кротонил-КоА из пирувата у микроорганизмов, обладающих метиласпартатным путем. Однако это предположение нуждается в проверке. Часть сукцинил-КоА расходуется на образование пропионата. Трансформацию до пропионил-КоА осуществляет метилмалонил-КоА-декарбоксилазный мультиферментный комплекс, кодируемый генным кластером *mmdADCB*. Комплекс генерирует трансмембранный градиент натрия для запасаения энергии через Na^+ -зависимую АТФазу. Подобно действию EtfAB-Bcd комплекса, образование

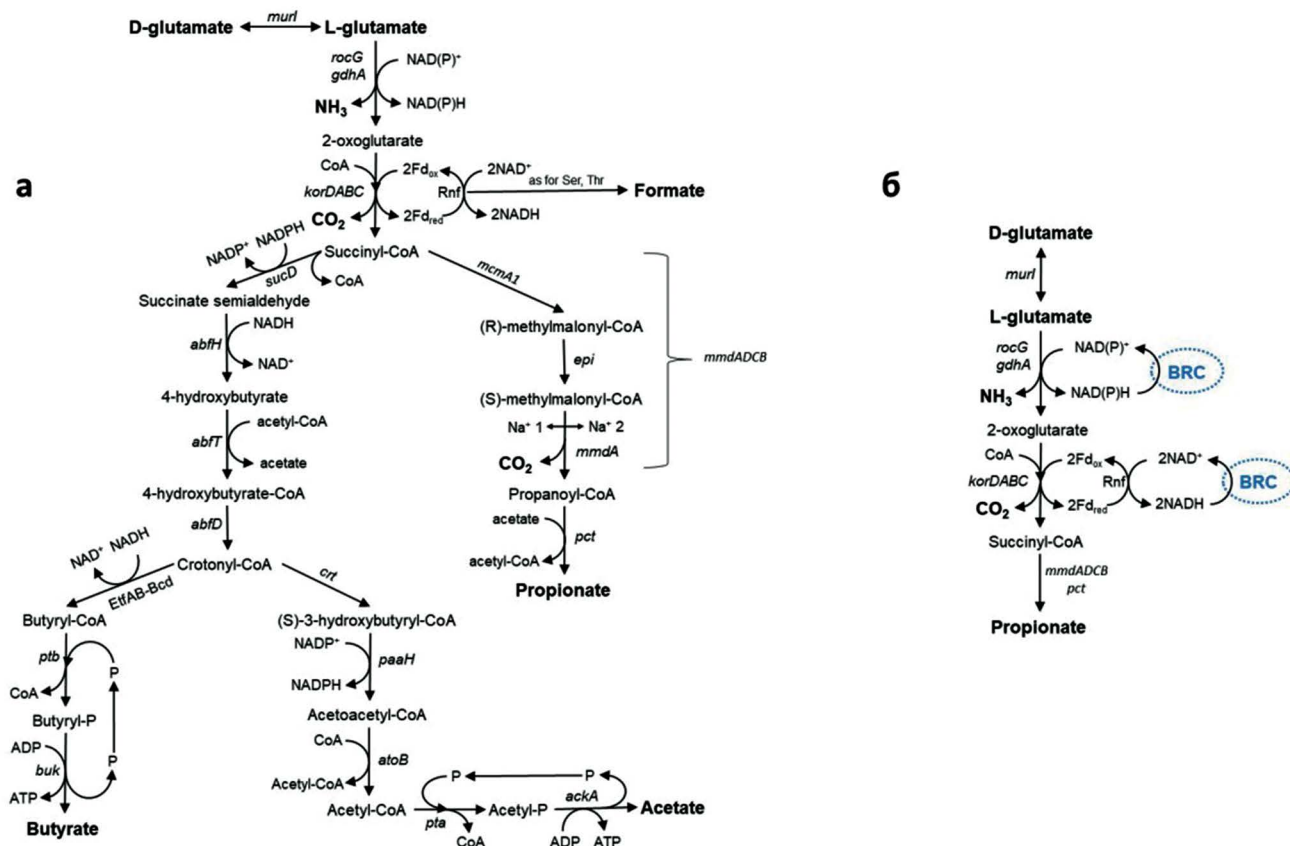


Рис. 2. Предлагаемая метаболическая схема разложения глутамата *A. sibiricum* Z-7981^T: а – без бетаина; б – с бетаином. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

пропионата также дает энергетический выход 0.5 моль АТФ на 1 моль субстрата (Buckel, 2021).

Анализ генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в разложении аспартата, показал наличие у *A. sibiricum* цикла трикарбоновых кислот с небольшими вариациями ферментов цикла (рис. 3).

В частности, конверсия изоцитрата в 2-оксоглутарат осуществляется изоцитратдегидрогеназой (ЕС 1.1.1.41), характерной для эукариот. Превращение сукцинил-КоА в сукцинат проводит сукцинил-КоА: ацетат КоА-трансфераза, впервые найденная у *Acetobacter aceti* (Mullins et al., 2008). В геноме *A. sibiricum* обнаружены все три известных фермента включения аспартата в цикл: аспартатаммонийлиаза, аспартаттрансаминаза и L-аспартатоксидаза, а также, помимо них, аспартаткиназа (ЕС 2.7.2.4), ответственная за биосинтез некоторых аминокислот. Примечательно, что несмотря на присутствие в цикле сукцинил-КоА, при использовании аспартата образуется только пропионат, а не смесь пропионата и бутирата, как в случае с глутаматом (табл. 2, рис. 2а). Ацетат образуется из пирувата, как показано для серина и треонина (рис. 1а).

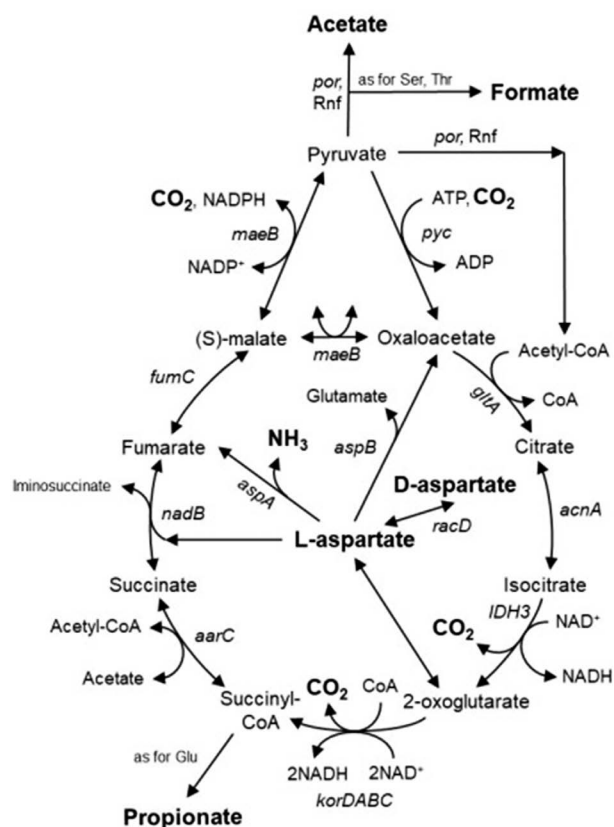


Рис. 3. Предлагаемая метаболическая схема разложения аспартата *A. sibiricum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

Основные аминокислоты — лизин и аргинин.

Анализ генома *A. sibiricum* Z-7981^T обнаружил все гены, кодирующие ферменты известного пути деградации лизина (Kreimeier et al., 2007). Реконструированная схема представлена на рис. 4а.

Первые четыре гена (*kamA*, *kamD*, *kamE*, *kdd*), наряду с генами, кодирующими белки с неизвестными функциями, собраны в кластер, характерный для представителей *Fusobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Alkaliphilus* и *Clostridium* (Kreimeier et al., 2007). В результате последовательной работы соответствующих ферментов, кодируемых этим кластером, из лизина удаляется одна молекула аммиака, а сам он превращается в 5-амино-3-оксогексаноат. Далее фермент ЕС 2.3.1.247 (дополнительные материалы, табл. S2), характерный только для организмов, использующих лизин, расщепляет образовавшийся 5-амино-3-оксогексаноат на 3-аминобутирил-КоА и ацетоацетат. Процесс протекает с одновременным присоединением ацетил-КоА. 3-аминобутирил-КоА деаминируется в кротонил-КоА аммонийлиазой, кодируемой геном *kal*, а затем восстанавливается до бутирил-КоА посредством комплекса EtfAB-Bcd, как в случае глутамата. Однако, в отличие от глутамата, бутират здесь образуется за счет действия двухсубъединичной бутират-ацетоацетат-КоА-трансферазы.

При анализе путей метаболизма аргинина было обнаружено, что в геноме штамма Z-7981^T имеются все четыре гена, кодирующие ферменты цикла мочевины: *argH*, *rocF*, *OTC*, *argG* (рис. 5).

Катаболический распад аргинина происходит, скорее всего, по аргиназному пути с отщеплением мочевины и последующим образованием орнитина, так как генов, кодирующих другие пути распада аргинина (ADI, AST, аргининтрансаминазный и аргининдекарбоксилазный), не найдено (Cunin et al., 1986). Известно, что у некоторых анаэробов дальнейшая деградация орнитина протекает через внутреннюю реакцию Стикланда, где в конце окислительной ветви образуется аланин, а в конце восстановительной — 5-аминовалерат (Fonknechten et al., 2009), причем эти продукты выделяются в среду. Однако мы не обнаружили их в культуральной жидкости штамма Z-7981^T. Более того, в геноме отсутствовал ген *prfF*, кодирующий пролинрацемазу (ЕС 5.1.1.4), необходимую для работы D-пролинредуктазы — конечного фермента восстановительной ветви. Примечательно, что в геноме также отсутствовал и ген *ODC*, кодирующий орнитиндекарбоксилазу (ЕС 4.1.1.17) (декарбоксилазный путь), следовательно, организм разлагает орнитин по другому пути.

Совместное использование аминокислот и бетаина в реакции Стикланда

Задачей следующего эксперимента было определить, влияет ли внесение бетаина на рост *A. sibiricum* с каждой из 20 протеиногенных

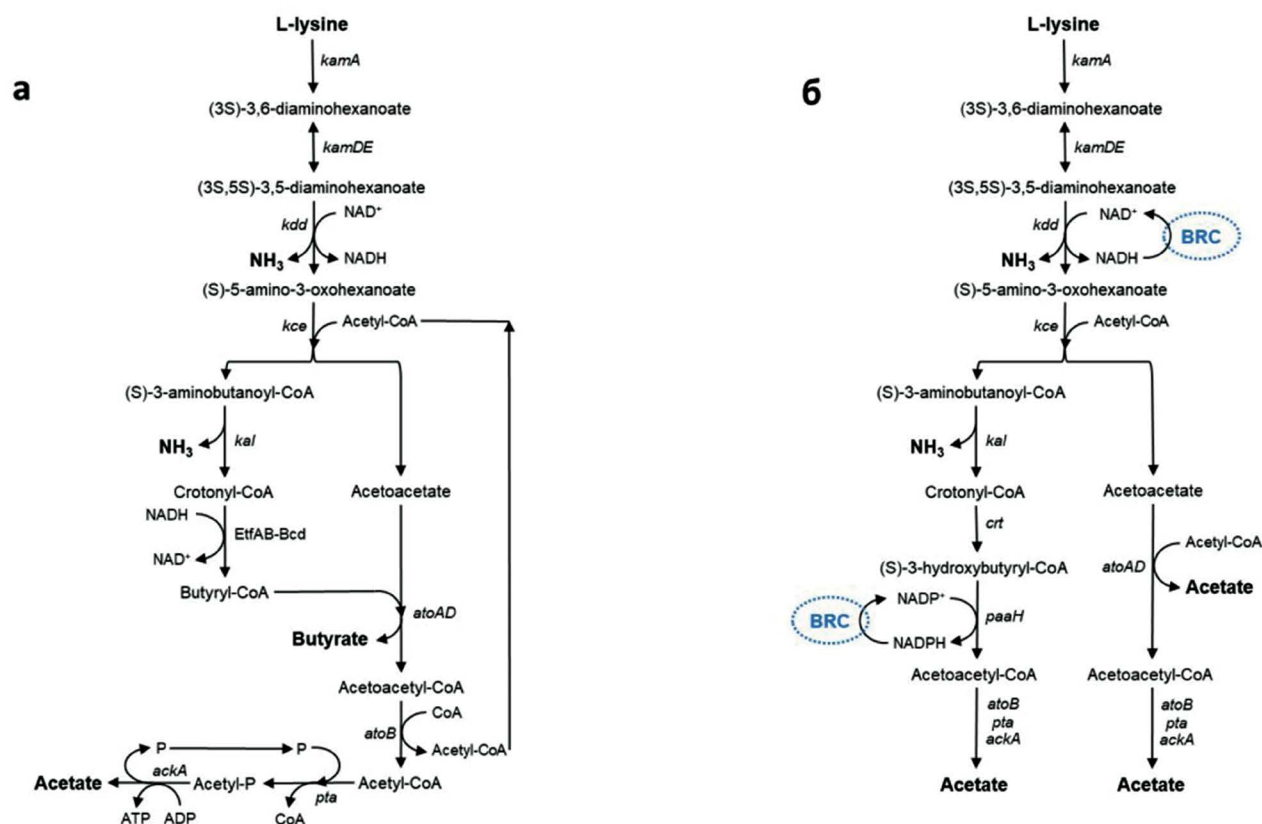


Рис. 4. Предлагаемая метаболическая схема разложения лизина *A. sibircum* Z-7981^T: а – без бетаина; б – с бетаином. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

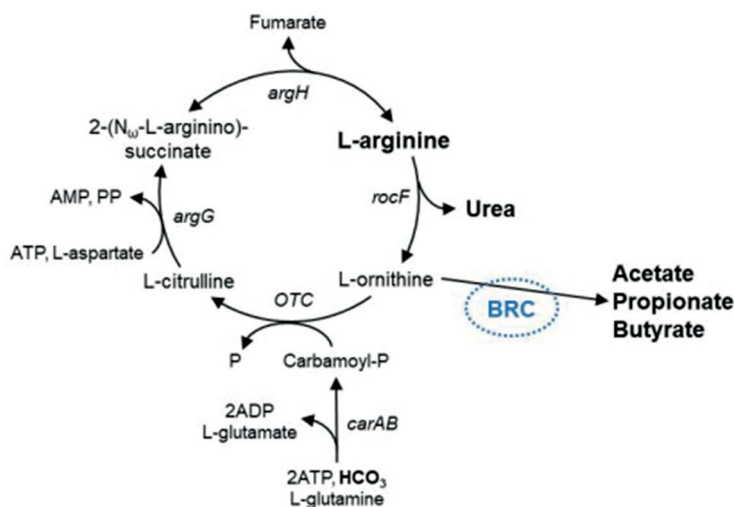


Рис. 5. Цикл мочевины при разложении аргинина *A. sibircum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

аминокислот. Найдено, что на всех аминокислотах, рассмотренных в предыдущем разделе, наблюдалась стимуляция роста (табл. 3).

Кроме того, в паре с бетаином были выявлены и другие аминокислоты, рост на которых в его отсутствие обнаружен не был, а именно аланин,

Таблица 3. Стимуляция роста *A. sibiricum* Z-7981^T бетаином

Аминокислота	ΔОП ₆₀₀		Коэффициент стимуляции роста
	– бетаин	+ бетаин	
Серин	0.05	0.11	2.2
Треонин	0.14	0.18	1.3
Аспартат	0.07	0.12	1.7
Глутамат	0.09	0.14	1.6
Лизин	0.08	0.16	2.0
Аргинин	0.08	0.11	1.4

Таблица 4. Аминокислоты, бетаин и продукты, измеренные в конце роста *A. sibiricum* Z-7981^T, и количественные соотношения между ними

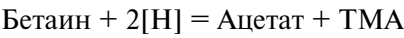
	ΔАК	ΔБет	ΔБет/ΔАК	ΔNH ₃	ΔNH ₃ /ΔАК	ТМА	ТМА/ΔБет	Ацетат	ДП	ДП/ΔАК
Ser+Бет	11.5	11.7	1.0	11.7	1.0	10.6	0.9	21.9	–	–
Thr+Бет	10.8	11.6	1.1	11.4	1.1	10.6	0.9	29.5	X	–
Glu+Бет	9.9	17.6	1.8	9.9	1.0	14.6	0.8	17.5	Пропионат 8.7	0.9
Asp+Бет	10.0	19.2	1.9	9.1	0.9	20.8	1.1	30.0	–	–
Lys+Бет	8.7	17.7	2.0	16.5	1.9	18.6	1.1	43.5	Следы бутирата	–
Arg+Бет	9.9	18.8	1.9	19.1	1.9	17.1	0.9	35.6	Следы пропионата	–
Ala+Бет	10.9	20.2	1.9	11.2	1.0	15.8	0.8	31.8	–	–
Leu+Бет	7.9	15.4	2.0	8.0	1.0	16.8	1.1	17.2	Изовалерат 7.5	1.0
Ile+Бет	4.9	10.6	2.1	4.4	0.9	10.8	1.0	12.0	2-Метилбутират 5.0	1.0
Val+Бет	5.4	11.4	2.1	4.7	0.9	10.8	1.0	13.2	Изобутират 4.7	0.9
Phe+Бет	7.4	15.5	2.1	8.0	1.1	14.5	0.9	17.1	Фенилацетат 7.3	1.0
Met+Бет	8.0	16.7	2.1	7.3	0.9	15.4	0.9	18.1	X	–

Примечание. X – неидентифицированный продукт.
Обозначения: Бет – бетаин; АК – аминокислота; ТМА – триметиламин; ДП – другой продукт, отличный от ТМА и ацетата. Все концентрации даны в мМ.

лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин и метионин. Стехиометрические соотношения, полученные для каждой пары аминокислота + бетаин, и образующиеся из них продукты показаны в табл. 4.

Общими для всех аминокислот продуктами являлись аммиак и ацетат, а также триметиламин как продукт восстановления бетаина. Кроме того, отмечено образование продуктов деградации, специфичных для некоторых аминокислот: изовалерата из лейцина, 2-метилбутирата из изолейцина, изобутирата из валина, фенилацетата из фенилаланина, пропионата из глутамата. При росте на треонине и метионине обнаружены нелетучие органические кислоты, которые не удалось идентифицировать.

Анализ генома показал наличие у штамма Z-7981^T транспортной системы для бетаина (*oriD*), а также трехкомпонентного глицин/саркозин/бетаинредуктазного комплекса ABC, сопряженного с тиоредоксин восстановительной системой (Andreesen, 2004). Субстратная специфичность комплекса определяется двухсубъединичным компонентом В, при этом геном содержит гены, кодирующие только глицин – (*grdEB*, ЕС 1.21.4.2) и бетаин- (*grdIH*, ЕС 1.21.4.4) редуктазу. Совместно с ацетаткиназой комплекс расщепляет бетаин на ацетат и триметиламин (ТМА) в стехиометрическом отношении 1 : 1 (рис. 6):



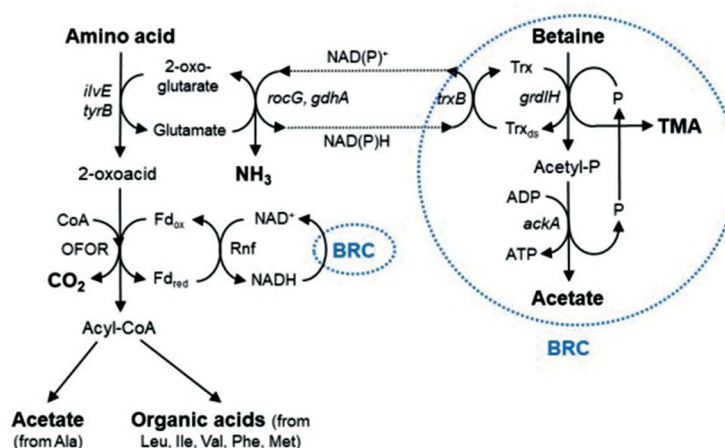


Рис. 6. Предлагаемая метаболическая схема разложения аланина, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина и метионина в присутствии бетаина для *A. sibiricum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

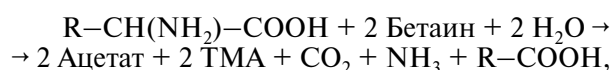
Восстановительные эквиваленты для этой реакции поступают на тиоредоксин из цепи окисления аминокислоты. Именно в местах их образования происходит сопряжение с бетаинредуктазным комплексом. Изменение потока электронов, связанное с включением бетаина в метаболизм, приводит к изменению состава продуктов (табл. 2). В частности, это проявилось в отсутствии формиата и бутирата (табл. 4).

Несмотря на то, что реакция Стикланда была открыта 90 лет назад (Stickland, 1934), подробные энзиматические исследования, касающиеся сопряжения окислительной и восстановительной ветвей реакции, выполнены лишь для некоторых аминокислот. Общая метаболическая схема распада аланина, лейцина, изолейцина, валина и фенилаланина в присутствии бетаина, построенная на основании литературных данных и подтвержденная анализом генома *A. sibiricum* Z-7981^T, показана на рис. 6.

Из схемы видно, что восстановительные эквиваленты поступают к бетаину из двух участков цепи окисления, а именно на этапе деаминации аминокислоты до 2-оксокислоты через глутаматдегидрогеназу и на этапе превращения 2-оксокислоты в соответствующий ацил-КоА через ферредоксин-зависимые оксидоредуктазы семейства OFOR (EC 1.2.7.-), гены которых найдены в геноме. В первом случае сопряжение производится посредством трансаминазы разветвленных аминокислот (EC 2.6.1.42), которая, несмотря на название, отличается широкой субстратной специфичностью и работает не только с разветвленными аминокислотами, но и, в частности, с метионином (Bezudnova et al., 2017). На втором участке сопряжения КоА-производные органических кислот подвергаются гидролизу с образованием соответствующих кислот, обозначенных в табл. 4 как

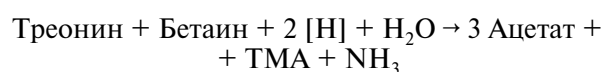
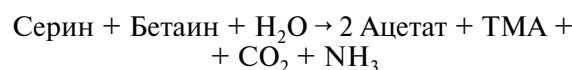
“другой продукт”. Мы предполагаем, что распад метионина также протекает в соответствии со схемой, показанной на рис. 6. В таком случае неидентифицированным продуктом роста *A. sibiricum* на метионине с бетаином может являться 3-(метилтио)пропионат. Образование сульфида и метантиола, характерных для альтернативных путей разложения метионина, не обнаружено.

Во всех указанных случаях на окисление одной молекулы аминокислоты расходуется две молекулы бетаина, что подтверждается нашими экспериментальными данными (табл. 4). Такая же стехиометрия была продемонстрирована и в самом первом сообщении об использовании бетаина как акцептора электронов в реакции Стикланда (Naumann et al., 1983):



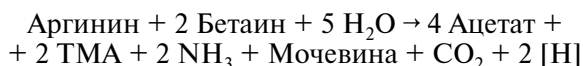
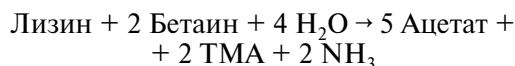
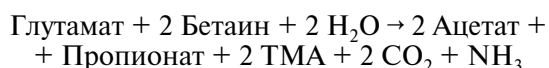
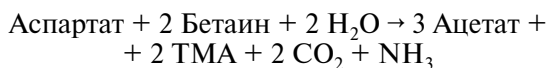
где R — CH₃ для аланина, а для лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина — структуры, соответствующие каждой аминокислоте.

В катаболическом пути распада серина и треонина восстановительные эквиваленты образуются только на этапе превращения пирувата в ацетил-КоА (рис. 1а), поэтому для этих аминокислот молярное соотношение с бетаином должно быть 1 : 1 (табл. 4). Для серина это показано ранее на примере *H. salinarum* (Mouné et al., 1999), для треонина литературных данных нет.



В соответствии со схемой (рис. 16), восстановительные эквиваленты, которые в случае отсутствия внешнего акцептора электронов идут на образование формиата, при наличии бетаина поступают на его восстановление, что приводит к отсутствию формиата среди продуктов. Неидентифицированный продукт, образующийся при росте на треонине с бетаином, скорее всего, не связан с участками образования восстановительных эквивалентов, так как его концентрация не зависела от наличия или отсутствия бетаина. В связи с этим в уравнении реакции он не учитывается.

Для остальных аминокислот молярное соотношение с бетаином оказалось равным 1 : 2 (табл. 4):



Учитывая места сопряжения бетаинредуктазного комплекса для хорошо изученных разветвленных аминокислот (рис. 6), а также изменившийся состав продуктов, можно предложить схему сопряжения для глутамата (рис. 26) и лизина (рис. 46), сведения о которых в литературе практически отсутствуют. При росте с глутаматом этот комплекс присоединяется на двух окислительных этапах — деаминирования глутамата до 2-оксоглутарата и декарбоксилирования 2-оксоглутарата посредством Rnf-комплекса до сукцинил-КоА. В случае лизина присоединение бетаинредуктазного комплекса также происходит на двух этапах — окислительного деаминирования 3,5-диаминогексаноата до 5-амино-3-оксогексаноата и трансформации 3-гидроксибутирил-КоА в ацетоацетил-КоА. В схеме разложения аспартата (рис. 3) имеется несколько участков возможного сопряжения, к которым теоретически может присоединяться бетаинредуктазный комплекс, и какие два из них задействованы фактически, на основании наших данных сказать невозможно. Также остались неясными места сопряжения и для аргинина, поскольку в цикле мочевины отсутствуют места образования восстановительных эквивалентов, а дальнейший путь разложения орнитина в нашем случае неизвестен (рис. 5). Для этих аминокислот требуются углубленные энзиматические исследования.

Таким образом, на основании полученных данных мы предполагаем, что основным способом утилизации бетаина микроорганизмами

из содовых озер является его использование в качестве акцептора электронов в паре с органическими веществами-донорами, в частности, с аминокислотами. За счет этого становится возможным сопряжение различных путей деградации веществ. В данной работе продемонстрирована совместная утилизация бетаина, одного из важнейших осморегуляторов, с метаболитами протеолитического пути деструкции биополимеров клетки. Кроме того, образующийся при восстановлении бетаина триметиламин, включаясь далее в трофическую цепь, дает начало метилотрофному метаногенезу — одному из ключевых терминальных анаэробных процессов деградации органических веществ в содовых озерах.

Присутствие акцептора расширило метаболические возможности организма. У *A. sibiricum* рост без бетаина был возможен только на серине, треонине, аспартате, глутамате, лизине и аргинине, тогда как в его присутствии этот список дополнился аланином, лейцином, изолейцином, валином, фенилаланином и метионином, не использующимися индивидуально. Также обнаружено, что совместное использование аминокислоты с бетаином привело к изменению состава продуктов обмена *A. sibiricum*. Это связано с перенаправлением потока электронов при включении бетаина в биохимические цепи в местах образования восстановительных эквивалентов.

Данные полногеномного секвенирования позволили составить метаболические схемы разложения аминокислот в присутствии и в отсутствие бетаина. В большинстве случаев предложены места включения бетаинредуктазного комплекса в метаболизм аминокислот у *A. sibiricum*. Схемы, составленные с участием этого комплекса, подтверждены стехиометрическими параметрами, полученными из ростовых экспериментов, причем такие схемы и уравнения для треонина, глутамата и лизина в литературе отсутствуют и предложены нами впервые. Данная работа расширяет представления о трофических цепях с участием бетаина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н. Т.Н. Жилюной за предоставление культур микроорганизмов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках госзадания № 122041100029-2 ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование генома *A. sibiricum* Z-7981^T проведено в рамках выполнения работ по Соглашению № 075-15-2021-1051 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В. Дегградация глицинбетаина в реакции Стикланда галоалкалофильной бактерией *Halonatronomonas betaini*, выделенной из содового озера Танатар III // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 720–725.
- Detkova E.N., Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V. Glycine betaine degradation via the Stickland reaction by a haloalkaliphilic bacterium *Halonatronomonas betaini* isolated from the Tanatar III soda lake // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 721–726.
- Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Новая экстремально галофильная гомоацетатная бактерия *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Доклады АН СССР. 1990. Т. 311. С. 745–747.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. A new extremely halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Dokl. Akad. Nauk USSR. 1990. V. 311. P. 745–747.
- Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Кевбрин В.В. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 579–599.
- Zavarzin G.A., Zhilina T.N., Kevbrin V.V. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 503–521.
- Andreesen J.R. Glycine reductase mechanism // Curr. Opin. Chem. Biol. 2004. V. 8. P. 454–461.
- Bezudnova E.Yu., Boyko K.M., Popov V.O. Properties of bacterial and archaeal branched-chain amino acid aminotransferases // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1572–1591.
- Biegel E., Schmidt S., González J.M., Müller V. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 613–634.
- Buckel W. Energy conservation in fermentations of anaerobic bacteria // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 703525.
- Buckel W. Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. P. 263–273.
- Chang A., Jeske L., Ulbrich S., Hofmann J., Koblit J., Schomburg I., Neumann-Schaal M., Jahn D., Schomburg D. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. D498–D508.
- Cunin R., Glansdorff N., Piérard A., Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria // Microbiol. Rev. 1986. V. 50. P. 314–352.
- Fan C., Bobik T.A. The PduX enzyme of *Salmonella enterica* is an L-threonine kinase used for coenzyme B12 synthesis // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 11322–11329.
- Fonknechten N., Perret A., Perchat N., Tricot S., Lechaplais C., Vallenet D., Vergne C., Zaparucha A., Le Paslier D., Weissenbach J., Salanoubat M. A conserved gene cluster rules anaerobic oxidative degradation of L-ornithine // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 3162–3167.
- Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Lysenko A.M. *Anoxynatronum sibiricum* gen. nov., sp. nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region) // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 213–220.
- Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes // Soda lakes of East Africa / Ed. Schagerl M. Springer International Publishing, Switzerland, 2016. P. 97–147.
- Heijthuijsen J.H.F.G., Hansen T.A. Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains // Arch. Microbiol. 1989. V. 152. P. 393–396.
- Hetzel M., Brock M., Selmer T., Pierik A.J., Golding B.T., Buckel W. Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 902–910.
- Kreimeyer A., Perret A., Lechaplais C., Vallenet D., Médigue C., Salanoubat M., Weissenbach J. Identification of the last unknown genes in the fermentation pathway of lysine // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 7191–7197.
- La Cono V., Arcadi E., La Spada G., Barreca D., Laganà G., Bellocco E., Catalfamo M., Smedile F., Messina E., Giuliano L., Yakimov M.M. A three-component microbial consortium from deep-sea salt-saturated anoxic Lake Thetis links anaerobic glycine betaine degradation with methanogenesis // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 500–517.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Mouné S., Manac'h N., Hirschler A., Caumette P., Willison J.C., Matheron R. *Haloanaerobacter salinaris* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 103–112.
- Mullins E.A., Francois J.A., Kappock T.J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 4933–4940.
- Müller E., Fahlbusch K., Walther R., Gottschalk G. Formation of N,N-dimethylglycine, acetic acid, and butyric

- acid from betaine by *Eubacterium limosum* // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 42. P. 439–445.
- Naumann E., Hippe H., Gottschalk G. Betaine: New oxidant in the Stickland reaction and methanogenesis from betaine and L-alanine by a *Clostridium sporogenes*–*Methanosarcina barkeri* coculture // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 474–483.
- Sorokin D. Y., Tourova T. P., Henstra A. M., Stams A. J. M., Galinski E. A., Muyzer G. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. a novel lineage of *Deltaproteobacteria* from hypersaline soda lakes // Microbiology (SGM). 2008. V. 154. P. 1444–1453.
- Sorokin D. Y. Microbial utilization of glycine betaine in hypersaline soda lakes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 569–577.
- Stickland L. H. Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): the chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy // Biochem. J. 1934. V. 28. P. 1746–1759.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K. D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Vasilinets I., Prjibelski A. D., Gurevich A., Korobeynikov A., Pevzner P. A. Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 3262–3268.
- Wang H., Gunsalus R. P. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 5076–85.
- Wang S., Huang H., Kahnt J., Thauer R. K. *Clostridium acidurici* electron-bifurcating formate dehydrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 6176–6179.
- Zhilina T. N., Zavarzin G. A. Alkaliphilic anaerobic community at pH 10 // Curr. Microbiol. 1994. V. 29. P. 109–112.
- Zhilina T. N., Zavarzina D. G., Kolganova T. V., Lysenko A. M., Tourova T. P. *Alkaliphilus peptidofragmentans* sp. nov., a new alkaliphilic bacterial soda lake isolate capable of peptide fermentation and Fe(III) reduction // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 445–454.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Genome Analysis and Reconstruction of Metabolic Pathways of Amino Acids and Betaine Degradation in the Haloalkaliphilic Bacteria *Anoxynatronum sibiricum*

E. N. Detkova¹, Yu. V. Boltyanskaya¹, N. V. Pimenov¹, A. V. Mardanov², V. V. Kevbrin¹ *

¹S. N. Winogradsky Institute of Microbiology, FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS,
Moscow, 119071, Russia

²K. G. Skryabin Institute of Bioengineering, FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS,
Moscow, 119071, Russia

*e-mail: kevbrin@inmi.ru

The genome of the haloalkaliphilic anaerobic microorganism *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T isolated earlier from the Nizhneye Beloye soda lake (Republic of Buryatia, Russia) was analyzed. The ability of the organism to use betaine as an electron acceptor in the Stickland reaction was revealed. The introduction of betaine into the medium not only stimulated growth on amino acids used by *A. sibiricum* individually, but also allowed identifying additional amino acids, growth on which was not possible without the acceptor. Based on the genomic characteristics and experimental growth data, metabolic schemes of amino acid degradation in the presence and absence of betaine were proposed. Schemes for threonine, glutamate and lysine when used together with betaine were compiled for the first time. For all amino acids used, the qualitative and quantitative composition of the metabolic products was determined and the stoichiometric substrate/product ratios were obtained. Balance equations for the identified variants of the Stickland reaction, including those previously not described in the literature, have been compiled.

Keywords: betaine, amino acids, Stickland reaction, haloalkaliphiles, soda lakes, betaine reductase complex