

## SEBATIAN METOKSIAROMATIK SEBAGAI SUBSTRAT PERTUMBUHAN DAN PENGARUH ENZIM DEMETILASE DALAM *ACETOBACTERIUM WOODII* DSM 1030

MOHD. SAHAID HJ. KALIL<sup>1</sup>, MUHAMMAD ZAKI<sup>2</sup>, WAN MOHTAR WAN  
YUSOFF<sup>3</sup> & MOHAMMAD RAMLAN MOHD. SALLEH<sup>4</sup>

**Abstrak.** Penyelidikan ini bertujuan untuk menyaring substrat organik bagi untuk penghasilan sel-sel *A. woodii* teraruh demetilase. Pertumbuhan *A. woodii* dilakukan dalam medium “Balch” yang mengandungi sumber karbon berbeza dalam keadaan anaerobik. Sebanyak sebelas substrat telah diuji iaitu anisol, 2- dan 3-metoksifenol, asid vanilik, asid siringik, asid 2,3,4-, 2,4,5- dan 3,4,5-trimetoksi benzoik, 2,3,4-, 2,4,5- dan 3,4,5-trimetoksi benzil alkohol. 2-metoksifenol merupakan substrat terbaik untuk pertumbuhan *A. woodii* pada kadar pertumbuhan spesifik  $0.14 \text{ j}^{-1}$ . Penghasilan sel-sel teraruh demetilase dilakukan dalam kultur kemostat pada kadar pencairan (D)  $0.0 \text{ j}^{-1}$ . Sel-sel pada keadaan mantap dituai dalam keadaan anaerobik dan dipekatkan sebelum digunakan. Pertumbuhan *A. woodii* didapati maksimum dengan menggunakan kepekatan  $0.62 \text{ g/L}$  2-metoksifenol sebagai sumber karbon tunggal. Tindak balas penyahmetilan oleh sel-sel *A. woodii* meningkat sebanyak 78% apabila 2-metoksifenol sebanyak  $0.31 \text{ g/L}$  ditambah dalam medium yang mengandungi fruktosa (1% w/v) semasa kultur kemostat.

**Kata kunci:** tindak balas penyahmetilan, demetilase, sel-sel tertuai, metoksiaromatik, *Acetobacterium woodii*

**Abstract.** The objective of this project was to screen organic substrate suitable for the growth of *A. woodii*, and as for the production of demethylase. *A. woodii* was grown in “Balch” medium containing different carbon sources. Eleven substrates were tested including anisole, 2- and 3-methoxyphenol, vanilic acid, syringic acid, 2,3,4-, 2,4,5- and 3,4,5-trimethoxy benzoic acid and 2,3,4-, 2,4,5- and 3,4,5-trimethoxy benzyl alcohol. It was found that 2-methoxyphenol was the best substrate with a specific growth rate of  $0.14 \text{ h}^{-1}$ . The production of demethylase induced cells was carried out in a chemostat culture at a dilution rate (D) of  $0.08 \text{ h}^{-1}$ . Cells were harvested at steady state of growth and concentrated before use. Optimal concentration of 2-methoxyphenol as the sole carbon source was  $0.62 \text{ g/L}$ . Demethylation reaction of  $0.31 \text{ g/L}$  2-methoxyphenol by induced culture increases 78% relative to the chemostat culture containing only fructose.

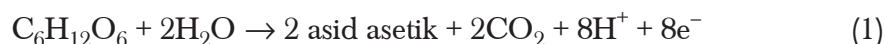
**Key words:** Demethylation reaction, demethylase, harvested cells, methoxyaromatic, *Acetobacterium woodii*

<sup>1,2&4</sup>Jabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses, Fakulti Kejuruteraan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi 43600, Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

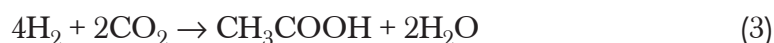
<sup>3</sup>Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi 43600, Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

## 1.0 PENGENALAN

Biotransformasi adalah suatu tindak balas di mana struktur molekul sebatian kimia organik diubah strukturnya oleh biomangkin. Sebagai contoh, dengan menggunakan bakteria anaerob *Acetobacterium woodii* DSM 1030, sebatian metoksiaromatik ditukar ubah kepada hidroksiaromatik [2]. *A. woodii* pertama kali dipencilkan oleh Schorberth dan Balch pada tahun 1975 dan dilaporkan ada kesamaan dengan bakteria metana [10]. Sama seperti bakteria metana [12], *A. woodii* juga dapat tumbuh dengan kehadiran H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> dan C<sub>1</sub> daripada kumpulan metoksiaromatik sebagai sumber karbon untuk penghasilan tenaga. Bakteria *A. woodii* digolong dalam kumpulan homoasetogenik dan dapat tumbuh secara anaerobik dengan pengoksidaan pelbagai sumber karbon [7]. Biasanya proses penerimaan elektron akan melibatkan penurunan CO<sub>2</sub> menjadi asid asetik dan tanpa kehadiran CO<sub>2</sub>, tindak balas penerimaan elektron tidak berlaku [6]. *A. woodii* menggunakan tapak jalan asetil-CoA [13] untuk penurunan CO<sub>2</sub> kepada asetat di mana ini berfungsi sebagai proses penerimaan elektron semasa pertumbuhan heterotrofik. Misalnya, apabila bakteria ini ditumbuhkan dalam substrat glukosa atau fruktosa, 3 mol asetat dapat dihasilkan daripada setiap mol gula heksosa yang difermentasi [3,7]. Dua mol asid asetik dihasilkan semasa kitar glikolisis (persamaan 1) dan satu mol asetat lagi dihasilkan daripada penurunan 2 mol CO<sub>2</sub> (persamaan 2).



Tapak jalan asetil-CoA juga berfungsi sebagai sistem pengikatan CO<sub>2</sub> semasa pertumbuhan autotrofik, misalnya, apabila bakteria ditumbuhkan dalam CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> (persamaan 3).



Apabila *A. woodii* ditumbuhkan dalam bahan C<sub>1</sub> seperti kumpulan metil daripada metoksiaromatik, bakteria tersebut berupaya menggunakan kumpulan metil untuk membentuk asetat (persamaan 4). Sebahagian daripada kumpulan metil yang dibebaskan daripada metoksiaromatik dioksidakan kepada CO<sub>2</sub> untuk mendapat tenaga (persamaan 5).



Oleh itu, tindak balas keseluruhan bagi penggunaan kumpulan metil adalah seperti persamaan 6.



Tindak balas penyahmetilan lebih sesuai menggunakan *A. woodii* kerana produk boleh terkumpul dan tidak terurai kepada CO<sub>2</sub>. Kajian terdahulu menunjukkan tindak balas penyahmetilan oleh bakteria aerob seperti *Pseudomonas fluorescens* [1], menghasilkan produk yang akan diurai kepada CO<sub>2</sub>. Manakala penggunaan fungus seperti *Cunninghamella elegans* [11] pula mengambil masa yang agak lama dengan kadar penyahmetilan yang agak rendah. Penyelidikan ini tertumpu kepada penghasilan sel-sel *A. woodii* teraruh demetilase untuk digunakan sebagai biomangkin bagi tindak balas penyahmetilan.

## 2.0 BAHAN DAN KAEDAH

*A. woodii* diperolehi daripada koleksi Deutche Sumlong Microorganismen (DSM 1030) dalam bentuk tulen dan diaktifkan secara anaerobik dalam atmosbag (Aldrich Co., USA). *A. woodii* dikulturkan secara anaerobik dalam media 'Balch' yang mengandungi fruktosa sebagai sumber karbon [3]. Pengeraman dan penyimpanan kultur dilakukan dalam balang anaerobik (Oxoid Co., USA). Substrat ujian terdiri daripada anisol, 2-metoksifenol, asid vanilik, asid siringik, 2,3,4-trimetoksi benzil alkohol, 2,4,5-trimetoksi benzil alkohol, 3,4,5-trimetoksi benzil alkohol, asid 2,3,4-trimetoksi benzoik, asid 2,4,5-trimetoksi benzoik, asid 3,4,5-trimetoksi benzoik dan 3-metoksifenol. Kajian kesan substrat berbeza terhadap pertumbuhan *A. woodii* dilakukan pada kepekatan substrat 5 mM dan 10 % inokulum. Medium pertumbuhan disediakan secara anaerobik mengikut kaedah Hungate [8]. Penuaian biojisim *A. woodii* dilakukan pada kelajuan 12,000 p.s.m. selama 5 minit menggunakan alat pengempar mikro (microcentrifuge). Pelet sel yang terhasil diampai dalam 15 ml penimbal fosfat pada pH 7 untuk ujian tindak balas penyahmetilan. Kepekatan katekol hasil dari tindak balas penyahmetilan 2-metoksifenol ditentukan dengan kaedah LaRue [9] dengan menggunakan 4-amino antipirin sebagai bahan uji. Satu unit keaktifan demetilase ditakrifkan sebagai mmol produk katekol terhasil per minit dalam asai enzim pada keadaan piawai.

## 3.0 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

### 3.1 Penyaringan Substrat Pengaruh Demetilase

Jadual 1 menunjukkan terdapat beberapa sebatian metoksiaromatik yang menyokong pertumbuhan *A. woodii*. Faktor seperti kedudukan kumpulan metoksi, kepekatan, dan kehadiran kumpulan gantikan lain seperti -OH, -COOH dan -CH<sub>2</sub>OH mungkin memberi kesan terhadap pertumbuhan *A. woodii*. Sebagai contoh anisol (metoksibenzena), didapati tidak menyokong pertumbuhan *A. woodii* dengan baik berbanding dengan 2-metoksifenol dan 3-metoksifenol yang mempunyai kumpulan gantikan -OH. Penyahmetilan anisol menghasilkan fenol yang toksik bagi strain *Acetobacterium* mungkin menyebabkan pertumbuhan yang kurang baik [2]. Kultur

yang mengandungi 2-metoksifenol menunjukkan pertumbuhan lebih baik (berdasarkan ketumpatan optik maksimum) berbanding 3-metoksifenol menunjukkan bahawa faktor kedudukan kumpulan metoksi pada *meta* atau *para* juga mempengaruhi pertumbuhan. Kesan kedudukan kumpulan metoksi juga berlaku semasa pengkulturan dengan medium yang mengandungi asid trimetoksibenzoik di mana asid 3,4,5-trimetoksibenzoik merupakan substrat terbaik berbanding asid 2,3,4- dan 2,4,5-trimetoksibenzoik yang mempunyai formula molekul yang sama. Walau bagaimanapun, pertumbuhan dengan asid 3,4,5-trimetoksibenzoik adalah 37% lebih rendah berbanding 2-metoksifenol. Ketumpatan optik maksimum yang dicapai dengan 2-metoksifenol adalah 11% lebih tinggi berbanding 3-metoksifenol. Oleh itu, 2-metoksifenol telah digunakan untuk penghasilan sel-sel teraruh demetilase dengan anggapan bahawa substrat terbaik untuk pertumbuhan merupakan substrat terbaik bagi aruhan enzim demetilase. Ini adalah kerana *A. woodii* tidak akan dapat memanfaatkan kumpulan metil pada bahan aromatik tersebut sebagai sumber karbon tanpa terlebih dahulu memutuskan ikatan O-CH<sub>3</sub> melalui tindak balas penyahmetilan oleh enzim demetilase. Oleh itu *A. woodii* tidak akan dapat tumbuh dalam medium

**Jadual 1** Kesan substrat yang berbeza terhadap pertumbuhan *A. woodii*

Substrat	Bacaan Serapan Maksimum pada 660 nm	Masa untuk mencapai bacaan serapan maksimum (jam)	Kadar pertumbuhan spesifik $\mu(\text{jam}^{-1})$
<b>Kawalan</b> (tanpa metoksiaromatik)	0.02	24	–
Anisol	0.10	103	0.04
2-metoksifenol	0.20	72	0.14
3-metoksifenol	0.18	72	0.14
4-hidroksi-3-metoksibenzoat (Asid vanilik)	0.10	72	0.03
4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (Asid syringik)	0.09	79	–
2,3,4-trimetoksi benzil alkohol	0.06	72	0.01
2,4,5-trimetoksi benzil alkohol	0.06	55	0.02
3,4,5-trimetoksi benzil alkohol	0.05	48	0.01
Asid 2,3,4-trimetoksi benzoik	0.05	72	0.02
Asid 2,4,5-trimetoksi benzoik	0.07	72	0.02
Asid 3,4,5-trimetoksi benzoik	0.13	79	0.11

yang mengandungi metoksiaromatik yang gagal mengaruh enzim demetilase dalam *A. woodii*.

### 3.2 Kesan 2-metoksifenol ke atas Penghasilan Katekol dan Peratus Transformasi

Jadual 2 menunjukkan kepekatan katekol meningkat dengan peningkatan kepekatan 2-metoksifenol dalam medium. Walau bagaimanapun, peratus transformasi didapati menurun apabila kepekatan melebihi 0.31 g/L. Ini mungkin disebabkan oleh ketoksikan substrat pada kepekatan yang tinggi. Apabila kepekatan substrat melebihi 0.31 g/L, didapati jumlah biojisim sel yang terhasil semakin berkurang. Peratus transformasi 2-metoksifenol daripada kultur yang tumbuh adalah 84% pada kepekatan 0.31g/L, sedangkan pada 0.62 g/L 2-metoksifenol transformasi hanya 70%, diikuti dengan 47% bagi kepekatan 1.24 g/L. Walaupun medium yang mengandungi kepekatan 1.24 g/L memberikan kepekatan produk katekol tertinggi, nilai katekol terhasil per 2-metoksifenol ( $Y_{p/s}$ ) adalah paling rendah (47%). Dalam operasi pada skala lebih besar, nilai  $Y_{p/s}$  yang tertinggi biasanya digunakan. Jadi, untuk kajian seterusnya dalam kultur selanjara kemostat, 0.31g/L 2-metoksifenol digunakan untuk mengaruh penghasilan demetilase oleh sel-sel *A. woodii*.

**Jadual 2** Kesan kepekatan 2-metoksifenol ke atas produk (katekol) dan peratus transformasi

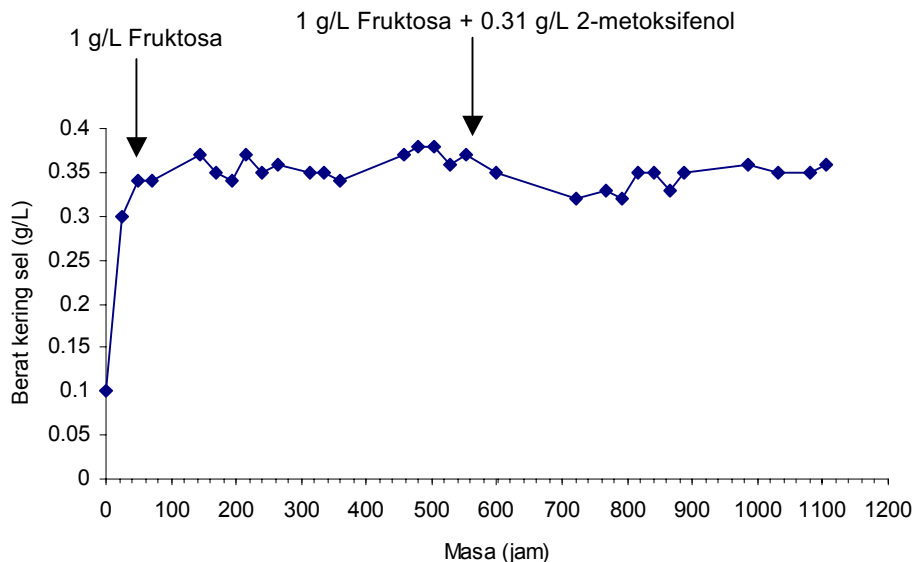
Kepekatan 2-metoksifenol (g/L)	Berat kering sel (g/L)	Kepekatan produk katekol (g/L)	Peratus transformasi atau $Y_{p/s}$
0.00 (Kawalan)	0.74	0.00	–
0.12	0.74	0.04	40%
0.31	0.74	0.23	84%
0.62	0.7	0.39	70%
0.93	0.66	0.50	60%
1.24	0.58	0.52	47%

### 3.3 Penghasilan Sel-sel Teraruh Demetilase

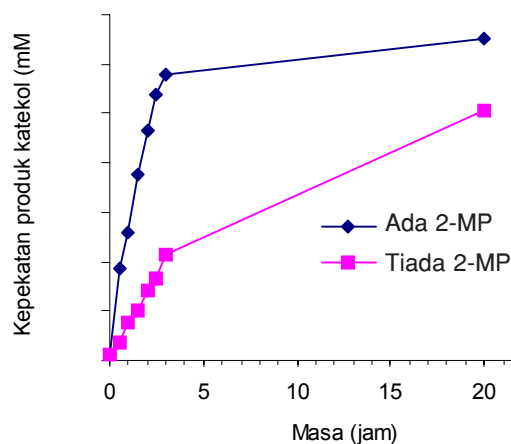
Kultur kemostat diguna dengan aliran selanjara medium segar yang mengandungi fruktosa atau fruktosa ditambah 2-metoksifenol (0.31g/L). Rajah 1 menunjukkan profil pertumbuhan *A. woodii* dalam kultur kemostat. Pada keadaan mantap kepekatan biojisim kedua-dua kultur adalah  $0.400 \pm 0.010$  g/L dan  $0.395 \pm 0.015$  g/L. Rajah 2 menunjukkan sel-sel biojisim *A. woodii* yang dituai dari kedua-dua kultur fruktosa dan kultur fruktosa ditambah 2-metoksifenol mampu melakukan penyahmetilan, tetapi, pada kadar yang berbeza disebabkan keaktifan enzim yang berbeza bagi kedua-dua kultur. Kadar penyahmetilan oleh sel-sel tertuai *A. woodii* dari kultur yang ditambah 2-

metoksifenol didapati 78% lebih tinggi berbanding fruktosa sahaja. Aktiviti enzim demetilase daripada sel-sel kultur yang di tambah 2-metoksifenol adalah 3.89 U/ml, manakala aktiviti enzim dari kultur tanpa 2-metoksifenol adalah 2.18 U/ml. Peningkatan aktiviti menunjukkan bahawa 2-metoksifenol telah mengaruh sel-sel *A. woodii*. sel-sel yang dituai dari kultur fruktosa tanpa 2-metoksifenol juga didapati berkeupayaan menjalani penyahmetilan, tetapi, pada kadar yang lebih rendah. Ini menunjukkan sintesis enzim demetilase masih berlaku dalam sel-sel *A. woodii* yang dikulturkan dalam medium mengandungi fruktosa tanpa 2-metoksifenol. Semasa ditumbuh dengan fruktosa, bakteria tersebut menggunakan tapak jalan tetrahydrofolat (THF) di mana metiltetrahydrofolat dinyahmetil kepada tetrahydrofolat oleh enzim demetilase [4,5]. Walau bagaimanapun, mekanisme biokimia di mana 2-metoksifenol dapat meningkatkan sintesis demetilase oleh *A. woodii* masih belum diketahui.

Kultur sel yang diaruh dan tidak teraruh sememangnya menghasilkan jumlah enzim tertentu per unit isipadu. Jika sampel dari kedua-dua sel digunakan sebagai sumber enzim, memang dijangkakan keaktifan enzim adalah berbeza. Walau bagaimanapun, jika dua kepekatan enzim yang berbeza digunakan plot seperti Rajah 2 adalah dijangkakan. Tahap maksimum tercapai dengan cepat jika banyak enzim digunakan. Jika hanya sedikit enzim digunakan, tindak balas juga akan mencapai tahap maksimum yang sama jika masa yang cukup diberikan dengan anggapan enzim tidak ternyahaktif dalam tempoh tersebut.



**Rajah 1** Pertumbuhan *A. woodii* dalam kultur kemostat terhad fruktosa (dengan dan tanpa 2-metoksifenol)



**Rajah 2** Tindak balas penyahmetilan oleh sel-sel tertuai *A. woodii*

#### 4.0 KESIMPULAN

*A. woodii* mampu ditumbuhkan dalam medium yang mengandungi 2-metoksifenol, 3-metoksifenol dan asid trimetoksibenzoik sebagai substrat. Pertumbuhan yang terbaik adalah menggunakan 2-metoksifenol. Sel-sel teraruh demetilase telah berjaya dihasilkan dengan mengkultur *A. woodii* secara selanjur pada kepekatan 0.31g/L 2-metoksifenol dan telah meningkatkan keaktifan demetilase sebanyak 78%.

#### PENGHARGAAN

Projek ini dibiayai oleh geran penyelidikan IRPA 09-02-02-0025.

#### RUJUKAN

- [1] Andreoni, V., S. Bernasconi and G. Bestetti. 1995. Biotransformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 830-835.
- [2] Bache, R., and N. Pfennig. 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylate aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* 130: 255-261.
- [3] Balch, W. E., S. Schorberth, R. S. Tanner and R.S. Wolfe. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 358-361.
- [4] Berman, M. H. and A. C. Frazer. 1992. Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic O-demethylation reaction for phenylmethylethers. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 925-931.
- [5] Kasmi, A. El., S. Rajasekharan and S. W. Ragsdale. 1994. Anaerobic pathway for conversion of the methyl group of aromatic methyl ethers to acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* 33: 11217-11224.
- [6] Drake, H. L. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the Acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" Pathway: Past and Current Perspectives In : *Acetogenesis* (Drake, H.L, Eds), pp 1-60 Chapman & Hall Newyork London.
- [7] Fuchs, G. 1986. CO<sub>2</sub> fixation in acetogenic bacteria: variations on theme. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 181-213.
- [8] Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict Anaerobes In : *Methods in Microbiology* (Norris, J.R. dan Ribbons, D.W., Eds), 3B: 117-132. London.

- [9] LaRue, T. A. 1964. Spectrophotometric determination of catechols with 4-aminoantipyrine *Anal. Chim. Acta.* 31: 400-403.
- [10] Mayer, F., R. Lurz, and S. Schorberth. 1977. Electron microscopic investigation of the hydrogen-oxidizing acetate forming anaerobic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 115: 207-213.
- [11] Smith, R. V., and P. J. Davis. 1978. Regiospective synthesis of isoapocodein from 10,11 dimethoxyaporphine by using *Cunninghamella elegans*. *Appl. Env. Microbiol.* 35: 738-742.
- [12] Wolfe, R. S. 1971. Microbiol formation of methane *Adv. Microbiol. Physiol.* 8: 107-146.
- [13] Wood, H. G., S. W. Ragsdale and E. Pezacka, 1986. The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 345-362.