

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 579.841:577.15

## МЕТАБОЛІЗМ $C_2$ - $C_6$ -СУБСТРАТІВ В УМОВАХ МІКСОТРОФНОГО РОСТУ ШТАМІВ *Acinetobacter* sp. В-7005 ТА В-7005 (ІНГ)

Т. П. ПИРОГ<sup>1,2</sup>, Ю. В. КУЗЬМІНСЬКА<sup>2</sup>, М. О. КОВАЛЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій, Київ, Україна;

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ;

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Исследована активність ключевих ферментів  $C_2$ - $C_6$ -метаболізму при вирощуванні штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (ІНГ) на суміші етанолу і глюкози. В умовах міксотрофного росту бактерій активність ферментів метаболізму етанолу ( $NAD^+$ -залежної алкогольдегідрогенази,  $NADP^+$ -залежної ацетальдегіддегідрогенази, ацетил-КоА-синтетази) і ферментів метаболізму глюкози (6-фосфофруктокінази і 6-фосфоглюконатдегідратази) була нижче, ніж на відповідних моносубстратах. Більш помітним (порівняно з культивуванням на етанолі) було зниження активності ізоцитратлиази і малатсинтази, що може свідечувати про незначительну роль гліоксилатного циклу в метаболізмі бактерій при рості на суміші  $C_2$ - $C_6$ -субстратів. Одночасне функціонування гліоксилатного циклу і піруваткарбоксилазної реакції, підвищення активності фосфоэнолпіруватсинтетази свідечує про посилення глюконеогенезу в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (ІНГ).

**К л ю ч е в е с л о в а:** міксотрофний ріст, метаболізм етанолу, метаболізм глюкози, глюконеогенез, ключеві ферменти.

**П**родуцентом комплексного полісахаридного препарату (ЕПС) – етаполану [1] є *Acinetobacter* sp. В-7005. Для синтезу ЕПС може бути використано широкий набір субстратів (етанол, ацетат,  $C_4$ -дикарбонові кислоти, вуглеводи – моно- і дисахариди, крохмаль та ін.). За здатністю утворювати ЕПС на багатьох субстратах штам В-7005 вигідно відрізняється від відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують полісахариди тільки при вирощуванні на вуглеводах (*Xanthomonas campestris*, *Azotobacter vinelandii*, *Sclerotium glucanicum*, *Aureobasidium pullulans* та ін.).

У попередніх дослідженнях показано можливість інтенсифікації синтезу етаполану на суміші енергонерівноцінних ростових субстратів (глюкоза + етанол) [2, 3]. Аналіз шляхів  $C_2$ - $C_6$ -метаболізму в даних бактерій дозволив класифікувати етанол як енергонадлишковий, а глюкозу – як енергодефіцитний субстрат [4, 5]. За теоретичними розрахунками енергетичних потреб для синтезу етаполану та для утворення біомаси штамом В-7005 визначено співвідношення концентрацій етанолу і глюкози, яке дозволяє уникнути непродуктивних утрат вуглецю та енергії, які мають місце в разі використання моносубстратів, та підвищити ефективність конверсії вуг-

лецю субстратів в ЕПС. Введення етанолу в середовище із глюкозою в молярному співвідношенні 3,1 : 1,0 дозволило збільшити кількість синтезованого етаполану в 1,8–1,9 рази, його вихід по відношенню до біомаси в 1,4–1,7 рази, а вихід в залежності від субстрату в 1,5–2 рази порівняно з вирощуванням бактерій на моносубстратах [2, 3]. Встановлено, що у разі культивування продуцента етаполану на суміші етанолу з глюкозою обидва субстрати споживаються водночас, при цьому в 1,3–1,4 рази підвищується максимальна питома швидкість росту і скорочується в 4–6 разів час її досягнення.

Мета даної роботи полягала у визначенні активності ключових ферментів  $C_2$ - $C_6$ -метаболізму у разі вирощування бактерій на суміші ростових субстратів та встановленні механізмів, які забезпечують підвищення синтезу етаполану в умовах міксотрофного росту бактерій.

### Матеріали і методи

Як об'єкт досліджень використовували штам бактерій *Acinetobacter* sp. В-7005, який утворює ЕПС і описаний нами в роботі [1], а також мутант штаму *Acinetobacter* sp. В-7005, що не синтезує ЕПС, одержаний раніше за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу з вихідного шта-

му [6]. ЕПС-мутант штаму В-7005 названо *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ). Показано, що вихідний штам та його мутант не відрізняються між собою за рядом характерних для цих бактерій фізіолого-біохімічних ознак (потреба в ростових факторах, асиміляція моно- і дисахаридів, стійкість до антибіотиків та ін.). Ідентичність вихідного штаму та мутанту встановлена також на основі аналізу їхніх 16S рРНК [6].

Раніше мутант *Acinetobacter* sp В-7005 (1НГ) було використано для вивчення  $C_2$ -метаболізму даних бактерій [4, 7]. Результати ензиматичних та полярографічних досліджень підтверджено експериментами з використанням вихідного штаму, який синтезує ЕПС, що дозволило вдосконалити технологію одержання етаполану на основі  $C_2$ -субстратів [7].

Культивування штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8–7,0 упродовж 16–18 год до середини експоненційної фази росту на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $KH_2PO_4$  – 6,8;  $KOH$  – 1,8;  $KCl$  – 1,4;  $NH_4NO_3$  – 0,6;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,4;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0,1;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,001. У середовище додатково вносили 0,5% (за об'ємом) дріжджового автолізу та 0,0006% пантотенату кальцію.

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол в концентрації 0,5 та 1,0% за об'ємом, глюкозу в концентрації 0,5 та 1,0% за масою, а також суміш цих субстратів у співвідношенні 1 : 1.

Як посівний матеріал брали добову культуру, вирощену на змішаному агаризованому середовищі (МПА та сусло-агар у співвідношенні 1 : 1).

Для одержання екстрактів бактеріальну суспензію після культивування *Acinetobacter* sp. В-7005(1НГ) у рідкому мінеральному середовищі центрифугували (4000 г, 15 хв, 4 °С), осад двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М трис-НСІ-буфером (рН 7,0) за допомогою центрифугування (в тому самому режимі). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,0) та руйнували ультразвуком (УЗ, 22 кГц) 3 рази по 30 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Дезінтеграт центрифугували (12 000 г, 30 хв, 4 °С), осад відкидали, а супернатант використовували як безклітинний екстракт.

У разі одержання безклітинних екстрактів *Acinetobacter* sp. В-7005 культуральну рідину, яка містить бактеріальні клітини та ЕПС, попередньо обробляли ультразвуком, тому що в'язкий етаполан із високою молекулярною масою практич-

но неможливо відокремити від клітин м'якими методами. Культуральну рідину (клітини в експоненційній фазі росту) обробляли УЗ (22 кГц) упродовж 60 с, після чого центрифугували (5000 г, 10 хв, 4 °С). Осад клітин тричі відмивали від залишків середовища та ЕПС 0,05 М трис-НСІ-буфером (рН 7,0) за центрифугування (5000 г, 10 хв, 4 °С). Така УЗ-обробка культури призводить до розщеплення високомолекулярних ЕПС на низькомолекулярні фрагменти. При цьому істотно знижується в'язкість культуральної рідини, що дає можливість центрифугуванням відокремити клітини від фрагментів ЕПС. Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,0) та руйнували УЗ (22 кГц) 4 рази по 50 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Дезінтеграт центрифугували (12000 г, 30 хв, 4 °С), осад відкидали, а супернатант використовували як безклітинний екстракт.

Активність 6-фосфофруктокінази (2.7.1.11) аналізували за швидкістю утворення фруктозо-1,6-дифосфату, яку визначали за окисненням  $NADH$  при 340 нм у спряженій реакції з альдолазою, триозофосфатізомеразою та  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназою [8].

Активність 6-фосфоглюконатдегідратази (4.2.1.12) [8] та фосфоенолпіруватсинтетази (ФЕП-синтетази, синонім ФЕП-синтаза, систематична назва АТР: піруват, вода – фосфотрансфераза; робоча назва – піруват, вода – дикіназа; 2.7.9.2) [9] аналізували за швидкістю утворення пірувату, яку визначали окисненням  $NADH$  при 340 нм у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою. Активність ФЕП-синтетази аналізували також колориметрично за зниженням концентрації пірувату в реакційній суміші (реакція з динітрофенілгідразинном) при 445 нм [9].

Активність піруваткарбоксилази (6.4.1.1) [10] визначали за швидкістю утворення оксалоацетату і окисненням  $NADH$  при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою; активність аконітатгідратази (4.2.1.3) [11], фосфоенолпіруваткарбоксикінази [12] – за окисненням  $NADH$  при 340 нм; активність алкогольдегідрогенази (1.1.1.1), ацетальдегіддегідрогенази (1.2.1.3) [13], піруватдегідрогенази (1.2.2.2) [14],  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (1.2.4.2) [15], малатдегідрогенази (1.1.1.37) [16] – за відновленням  $NAD^+$ , а ізоцитратдегідрогенази (1.1.1.42) [17] та ацетальдегіддегідрогенази (1.2.1.4) [18] – за відновленням  $NADP^+$  при 340 нм.

Активність сукцинатдегідрогенази (1.3.99.1) [10] визначали за відновленням дихлорофеноліндофенолу за присутності феназинметасульфату при 600 нм; активність ацетил-КоА-синтетази

(6.2.1.1) [19] аналізували за утворенням ацетил-КоА, який реагує з гідроксиламіном з утворенням ацетилгідроксамату. Продукт реакції ацетилгідроксамату із хлорним залізом визначали спектрофотометрично при 540 нм.

Активність ацетаткінази (2.7.2.1) [20] визначали за утворенням ацетилфосфату, який за взаємодії з гідроксиламіном утворює ацетилгідроксамат; активність ізоцитратліази (4.1.3.1) [21] – за швидкістю утворення, а малатсинтази (4.1.3.2) [22] – за швидкістю поглинання фенілгідразону гліоксилату при 324 нм; активність фумарази (4.2.1.2) аналізували за утворенням фумарату при 300 (315) нм [10].

Активність ферментів визначали при температурі 28–30 °С, яка є оптимальною для росту даних бактерій, виражали в нмоль/хв на 1 мг білка, вміст білка – в безклітинних екстрактах за методом М. М. Bradford [23].

Швидкість окислення етанолу, ацетальдегіду, ацетату калію, глюкози та піровиноградної кислоти (ПВК) інтактними клітинами штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ), як швидкість дихання інтактних клітин за присутності субстратів, встановлювали за швидкістю поглинання кисню в реакційній суміші полярографічним методом за допомогою електрода закритого типу на полярографі ППТ-1 при температурі 28–30 °С. Питому швидкість поглинання кисню виражали в нмоль O<sub>2</sub>/хв на 1 мг клітин, концентрація субстратів складала 10 мМ.

Для визначення швидкості дихання *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ) їхні клітини після культивування на середовищі з глюкозою (0,5 і 1,0% мас.) та етанолом (0,5 і 1,0% за об'ємом), а також на суміші цих субстратів (16–18 год, експоненційна фаза росту) центрифугували (4000 g, 15 хв, 4 °С). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатним буфером (рН 7,0) центрифугуванням у такому самому режимі. Відмиті клітини ресуспендували у 0,05 М К<sup>+</sup>-фосфатному буфері (рН 7,0).

Для інкубації клітин при визначенні швидкості окислення субстратів використовували трис-НСІ-буфер (0,05 М, рН 7,0).

### Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях вивчали особливості С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-метаболізму штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ) при його культивуванні на моно-субстратах – етанолі та глюкозі [4, 5]. Було встановлено [4], що у разі вирощування цих бактерій на С<sub>2</sub>-субстратах окислення етанолу до ацетальдегіду здійснюється NAD<sup>+</sup>-залежною алкогольдегідрогеназою. Акцепторами електронів в ацетальдегіддегідрогеназній реакції є NAD<sup>+</sup> і NADP<sup>+</sup>. Залучення ацетату до метаболізму в *Acinetobacter* sp. В-7005 (1 НГ) відбувається за участю ацетил-КоА-синтетази; анаплеротичною послідовністю реакцій, які поповнюють пул С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот, є гліоксилатний цикл. При дослідженні С<sub>6</sub>-метаболізму у цих бактерій було встановлено [5], що катаболізм глюкози здійснюється шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса та Ентнера-Дудорова. Піруват залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) за участю піруватдегідрогенази. Анаплеротичною реакцією, яка забезпечує синтез інтермедіатів для конструктивного метаболізму, є карбоксилювання пірувату за допомогою ферменту піруваткарбоксилази.

Полярографічні дослідження показали, що клітинам *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ), які вирощено на суміші етанолу і глюкози в різних концентраціях, властива практично однакова швидкість дихання за присутності етанолу, ацетальдегіду, глюкози та піровиноградної кислоти (табл. 1). Однак швидкість окислення ацетату інтактними клітинами бактерій, що росли на середовищі з підвищеною концентрацією субстратів (1% етанол + 1% глюкоза), у 1,5 раза нижча, ніж у клітин, що культивували за більш низького вмісту етанолу та глюкози. Слід відзначити, що швидкість дихання за присутності етанолу, ацетальдегіду, ацетату, глюкози та ПВК у клітин, що

Т а б л и ц я 1. Швидкість дихання за присутності С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів інтактних клітин *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ), вирощених на етанолі, глюкозі та суміші цих субстратів

Джерело вуглецевого живлення	Швидкість дихання, нмоль O <sub>2</sub> /хв на 1 мг клітин за присутності:				
	етанолу	ацетальдегіду	ацетату калію	глюкози	ПВК
Етанол 0,5% + глюкоза 0,5%	76,0	81,5	62,1	62,5	59,3
Етанол 1,0% + глюкоза 1,0%	70,5	79,8	42,5	59,1	56,9
Етанол 0,5%	127,8	130,4	120,4	42,5	40,7
Етанол 1,0%	101,5	109,3	87,5	38,7	36,5
Глюкоза 0,5%	60,6	65,7	32,2	83,5	85,1
Глюкоза 1,0%	54,6	63,8	28,9	78,4	79,2

росли на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів, була нижчою, ніж у клітин, що вирощували на відповідних моносубстратах (табл. 1).

Дані визначення активності ключових ферментів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ) на суміші субстратів і моносубстратах (табл. 2) підтверджують зроблений нами раніше висновок про те, що незалежно від джерела вуглецевого живлення (етанол, глюкоза) клітини штаму В-7005 (1НГ) характеризуються високою активністю ключових ферментів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму [5], за виключенням активності ізоцитратліази при вирощуванні бактерій на глюкозі.

Слід зазначити, що при вирощуванні бактерій на суміші субстратів активність ферментів метаболізму C<sub>6</sub>-субстратів є нижчою, ніж за росту на моносубстратах (глюкоза), як і активність ферментів метаболізму C<sub>2</sub>-субстратів порівняно з метаболізмом клітин, які культивували на етанолі (табл. 2). Привертає увагу істотне зниження ізоцитратліазної активності за культивування на суміші етанолу і глюкози порівняно з вирощуванням цих бактерій на етанолі, причому активність цього ферменту знижується з підвищенням у середовищі концентрації даних субстратів. У зв'язку з цим припустили, що ацетил-КоА, який утворюється з етанолу в ацетаткіназній та ацетил-КоА-синтетазній реакціях, включається до подальшого метаболізму переважно через ЦТК, а не гліоксилатний цикл. Дійсно, у разі вирощування бактерій на суміші етанолу і глюкози активність ферментів ЦТК вища, ніж у разі вирощування на моносубстраті – етанолі, в той час як активність обох ферментів гліоксилатного циклу (малатсинтази та ізоцитратліази) знижується

в 3–4 рази (табл. 2, 3).

Ймовірно, що роль гліоксилатного циклу в метаболізмі продуцента етаполану на суміші субстратів не є такою суттєвою, як на етанолі. Тим більше, що в умовах міксотрофного росту бактерій спостерігали підвищення активності піруваткарбоксілази – ферменту анаплеротичної реакції, який забезпечує поповнення пулу C<sub>4</sub>-дикарбонових кислот під час вирощування на вуглеводах (табл. 3). Разом з тим, одночасне функціонування двох анаплеротичних шляхів (гліоксилатного циклу та піруваткарбоксілазної реакції) може свідчити про посилення глюконеогенезу у разі вирощування бактерій на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів. Дійсно, активність ФЕП-синтетази – ключового ферменту глюконеогенетичної гілки обміну речовин на двокомпонентному субстраті – майже в 1,5 рази вища, ніж на етанолі (табл. 3).

Наступний етап досліджень присвячений визначенню активності ферментів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму під час вирощування на суміші субстратів і моносубстратах штаму *Acinetobacter* sp. В-7005, який утворює ЕПС. Як видно з даних, наведених у табл. 4, активність ФЕП-синтетази у продуцента етаполану дещо вища, ніж у ЕПС-мутанту, в той час як активність ключових ферментів C<sub>2</sub>-метаболізму (NAD<sup>+</sup>-залежної дегідрогенази, ацетил-КоА-синтетази, ізоцитратліази) та C<sub>6</sub>-метаболізму (6-фосфоглюкокінази та піруваткарбоксілази) практично не відрізняється від активності цих ферментів в аналогічних умовах культивування мутантного штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ) (табл. 2 і 3). Таким чином, ензиматичні дослідження штаму *Acinetobacter* sp. В-7005, що синтезує ЕПС, підтвердили закономірності, визна-

Таблиця 2. Активність ключових ферментів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму за вирощування штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ) на етанолі, глюкозі та їхній суміші

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Джерело вуглецю					
	Етанол 0,5%	Глюкоза 0,5%	Етанол 0,5% + глюкоза 0,5%	Етанол 1,0%	Глюкоза 1,0%	Етанол 1,0% + глюкоза 1,0%
NAD <sup>+</sup> -залежна алкогольдегідрогеназа	296,8	118,8	170,4	339,1	135,1	213,9
NADP <sup>+</sup> -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	197,9	163,4	176,8	263,8	176,2	248,4
Ацетил-КоА-синтетаза	198,5	н.в.	143,6	139,5	н.в.	85,2
Ацетаткіназа	22,2	н.в.	19,5	18,9	н.в.	15,7
Ізоцитратліаза	165,5	5,4	40,3	130,0	4,1	19,7
6-Фосфоглюкокіназа	272,1	326,0	231,8	226,1	676,9	276,0
6-Фосфоглюконатдегідратаза	24,7	89,1	34,9	45,3	161,0	69,0

Примітка: тут і в табл. 3, 4 н.в. – не визначали.

Таблиця 3. Активність ферментів анаплеротичних шляхів, ЦТК та глікогеногенезу за вирощування штаму *Acinetobacter sp. B-7005* (1НГ) на етанолі, глюкозі та їхній суміші

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Джерело вуглецю		
	Етанол 0,5%	Глюкоза 0,5%	Етанол 0,5% + глюкоза 0,5%
Піруватдегідрогеназа	н.в.	102,1	116,4
Аконітатгідратаза	268,0	563,3	434,5
NADP <sup>+</sup> -залежна ізоцитратдегідрогеназа	630,0	1008,3	819,0
α-Кетоглутаратдегідрогеназа	93,4	411,3	227,0
Сукцинатдегідрогеназа	137,5	208,3	173,4
Фумараза	186,8	174,2	289,3
Малатдегідрогеназа	193,4	210,8	264,8
Малатсинтаза	171,2	н.в.	53,5
Ізоцитратліаза	165,5	5,4	40,3
Піруваткарбоксилаза	204,2	219,3	232,8
ФЄП-синтаза	1029,0	н.в.	1492,5

Таблиця 4. Активність ферментів C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-метаболізму при вирощуванні штаму *Acinetobacter sp. B-7005* на етанолі, глюкозі та їхній суміші

Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка	Джерело вуглецю		
	Етанол 0,5%	Глюкоза 0,5%	Етанол 0,5% + глюкоза 0,5%
NAD <sup>+</sup> -залежна алкогольдегідрогеназа	304,7	103,9	183,6
Ацетил-КоА-синтаза	203,5	н.в.	139,4
Ізоцитратліаза	172,3	4,9	47,8
6-Фосфоглюкокіназа	245,3	299,5	231,1
6-Фосфоглюконатдегідратаза	32,7	97,5	29,9
Піруваткарбоксилаза	197,4	225,3	245,9
ФЄП-синтаза	1231,1	н.в.	1743,4

чені для мутантного штаму.

При вирощуванні бактерій на етанолі досить високою є активність піруваткарбоксилази (табл. 3, 4) – ферменту, який каталізує карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату і функціонує як анаплеротична реакція в разі росту на вуглеводах [24]. Слід зауважити, що утворення пірувату під час культивування бактерій *Acinetobacter sp. B-7005* (1НГ) на C<sub>2</sub>-субстратах відбувається в оксалоацетатдекарбоксілазній реакції [2]. Разом з тим, у літературі є поодинокі дані щодо здатності піруваткарбоксилази здійснювати декарбоксилювання оксалоацетату з утворенням пірувату [25]. Цілком можливо, що за вирощування на етанолі штамів *Acinetobacter sp. B-7005* та *B-7005* (1НГ) цей фермент також бере участь в утворенні пірувату (як і оксалоацетатдекарбоксілаза). Однак на сьогодні фізіологічна роль піруваткарбоксилази у разі вирощування бактерій на C<sub>2</sub>-субстратах залишається не з'ясованою. Вивченню даного питання будуть присвя-

чені наші подальші дослідження.

Раніше було встановлено, що за вирощування *Acinetobacter sp. B-7005* на суміші етанолу та глюкози обидва субстрати споживаються водночас [2]. Дослідження, представлені в даній роботі, підтверджують міксотрофний характер росту бактерій на суміші субстратів.

Таким чином, нами встановлено, що в разі вирощування штамів *Acinetobacter sp. B-7005* та *B-7005* (1НГ) на суміші етанолу і глюкози активність ключових ферментів метаболізму C<sub>2</sub>-субстратів знижується, а ферментів ЦТК – підвищується порівняно з культивуванням їх на етанолі. Зниження малатсинтазної та ізоцитратліазної активності свідчить про незначну роль гліоксилатного циклу в метаболізмі бактерій у разі вирощування їх на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-сполук. Активність ключових ферментів гліколізу та шляху Ентнера-Дудорова на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів нижча, а активність піруваткарбоксилази вища, ніж на глюкозі як моносубстраті. Одночасне функ-

ціонування двох анаплеротичних шляхів (глюкоксилатного циклу та піруваткарбоксилазної реакції) та підвищення активності ФЕП-синтетази свідчать про посилення глюконеогенезу в умовах міксотрофного росту бактерій.

Одержані результати досліджень щодо ферментів штамів *Acinetobacter* sp. B-7005 та B-7005 (1НГ) є показником зміни напряму у них процесів біосинтезу на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів у бік утворення вуглеводів за порівняння з показниками їхнього росту на середовищі з відповідними моносубстратами.

**METABOLISM OF C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-SUBSTRATES UNDER MIXOTROPHIC GROWTH OF *Acinetobacter* sp. B-7005 AND B-7005 (1НГ) STRAINS**

*T. P. Pirog<sup>1,2</sup>, Yu. V. Kuzminskaya<sup>2</sup>, M. A. Kovalenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine;

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

**S u m m a r y**

Activities of the key enzymes of C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-metabolism were assayed under cultivation of *Acinetobacter* sp. B-7005 and B-7005 (1НГ) strains on ethanol and glucose mixture. Under mixotrophic growth of bacteria the enzymes activity of ethanol metabolism (NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase, NADP<sup>+</sup>-dependent acetaldehyde dehydrogenase, acetyl-CoA-synthetase) and glucose metabolism (6-phosphofruc-tokinase and 6-phosphogluconate dehydratase) was lower than that on corresponding monosubstrates. The activity of isocitrate lyase and malate synthase in cells grown on the substrate mixture declined to an even greater extent, indicating that the role of the glyoxylate cycle in such cells is insignificant. The simultaneous functioning of the glyoxylate cycle and pyruvate carboxylase reaction, increasing of phosphoenolpyruvate synthetase activity testify to the gluconeogenesis intensification under mixotrophic growth of *Acinetobacter* sp. B-7005 and B-7005 (1НГ).

**К е у w o r d s:** mixotrophic growth, ethanol metabolism, glucose metabolism, of the gluconeogenesis, key enzymes.

1. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р., Пинчук Г. Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединениях. Киев: Наук. думка. 1992. 212 с.
2. Пирог Т. П., Коваленко М. А. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации

- синтеза экзополисахарида этаполана на смеси этанола и глюкозы // Международн. конф. "Микробиология и биотехнология XXI столетия". Минск. 21–25 мая 2002. С. 56–57.
3. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В. // Микробиология. 2003. **72**, № 3. С. 348–355.
  4. Пирог Т. П., Соколов И. Г., Кузьминская Ю. В., Малащенко Ю. Р. // Там же. 2002. **71**, № 2. С. 222–229.
  5. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В. // Там же. С. 215–221.
  6. Пирог Т. П., Столяр С. М., Малащенко Ю. Р. // Там же. 2000. **69**, N 5. С. 674–680.
  7. Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. **39**, № 2. С. 180–188.
  8. Wheller P. R. // J. Gen. Microbiol. 1983. **129**, N 5. P. 1481–1495.
  9. Cooper R. A., Kornberg H. L. Methods in enzymology (Ed. Lowenstein J.M.). New York: Acad. Press. 1969. **13**. P. 309–314.
  10. Utter M. F., Keech D. B. // J. Biol. Chem. 1963. **238**, N 8. P. 2603–2608.
  11. O'Brien R. W., Geisler J. // J. Bacteriol. 1974. **119**, N 3. P. 661–665.
  12. Huei-Che Chang, Lane M. D. // J. Biol. Chem. 1966. **241**, N 10. P. 2413–2420.
  13. Beardmore-Gray M., Anthony C. // J. Gen. Microbiol. 1983. **129**, N 10. P. 2979–2983.
  14. Reed L. J., Willms C. R. Methods in enzymology (Ed. Wood W.A.). New York and London: Acad. Press. 1966. **9**. P. 247–265.
  15. Mukherjee B. B., Matthews J., Horney D. L., Reed L. J. // J. Biol. Chem. 1965. **240**, N 5. P. 2268–2269.
  16. Kitto G. B. Methods in enzymology (Ed. J. M. Lowenstein). New York and London: Acad. Press. 1969. **XIII**. P. 106–116.
  17. O'Brien R. W., Stern J. R. // J. Bacteriol. 1969. **98**, N 2. P. 388–393.
  18. Hommel R., Kurth J., Klebel H. P. // J. Basic Microbiol. 1988. **28**, N 1–2. P. 25–33.
  19. Beinert H., Green D. E., Hele P. et al. // J. Biol. Chem. 1953. **203**, N 1. P. 35–45.
  20. Rose I. A., Grunberg-Manago M., Korey S., Ochoa S. // Ibid. 1954. **211**, N 2. P. 737–756.
  21. Dixon G. H., Kornberg H. S. // Biochem. J. 1959. **72**, N 1. P. 195–196.
  22. Pearce J., Carr N. G. // J. Gen. Microbiol. 1967. **49**, N 2. P. 301–313.
  23. Bredford M. M // Anal. Biochem. 1976. **72**, N 3. P. 248–254.
  24. Jitrapakdee S., Wallace J. C. // Biochem. J. 1999. **340**. P.1–16.
  25. Attwood P. V., Cleland W. W. // Biochemistry. 1986. **25**, N 25. P. 8191–8196.

Отримано 23.06.2003