Биотехнология, 2005, № 5, С. 29–36

УДК 579.841: 577.114

Т.П. ПИРОГ[1,2,*], Ю.В. КОРЖ[2], Н.В. ЛАЩУК[1]

[1] Национальный университет пищевых технологий, Киев, *01033*

[2] Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины, Киев, *03143*

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Влияние способа приготовления посевного материала на синтез экзополисахарида этаполана

Исследована зависимость уровня синтеза микробного экзополисахарида этаполана при культивировании *Acinetobacter* sp. на средах с различными субстратами (этанол, ацетат, глюкоза, этанол+глюкоза) от способа получения посевного материала. Увеличение синтеза ЭПС на среде с глюкозой при использовании инокулята, выращенного на этанол- или ацетатсодержащей среде, обусловлено индукцией глюконеогенеза, о чем свидетельствует повышение активности ферментов глиоксилатного цикла (изоцитратлиазы и малатсинтазы), а также ключевого фермента глюконеогенеза фосфоенолпируватсинтетазы. Применение посевного материала, выращенного с использованием ацетата, при культивировании *Acinetobacter* sp. B-7005 на среде, содержащей этанол или смесь этанола и глюкозы, сопровождалось устранением ограничений по включению ацетата в бактериальный метаболизм, повышением активности ацетил-КоА-синтетазы, изоцитратлиазы, малатсинтазы и увеличением синтеза ЭПС. Обсуждаются возможные механизмы повышения активности ацетил-КоА-синтетазы при использовании инокулята, выращенного на среде с ацетатом.

Ключевые слова: биосинтез, глиоксилатный цикл, глюконеогенез, C_2-метаболизм, микробные экзополисахариды, способ получения инокулята.

Штамм *Acinetobacter* sp. B-7005 является продуцентом комплексного полисахаридного препарата этаполана [1]. В состав препарата входят нейтральный и два кислых компонента, один из которых ацилирован. Ацилированный и неацилированный полисахариды идентичны по молярному соотношению D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, L-рамнозы, D-глюкуроновой и пировиноградной кислот (3:2:1:1:1:1) и по структуре повторяющейся единицы углеводной цепи. Различие между этими ЭПС состоит в том, что ацилированный полисахарид содержит жирные кислоты (C_{12}—C_{18}) [2].

Этаполан является полисахаридом многофункционального назначения и может быть использован в нефтедобывающей, пищевой и химической отраслях промышленности в качестве загущающего, стабилизирующего, эмульгирующего и суспендирующего агента [1, 2].

Ранее нами была показана возможность синтеза этаполана с использованием широкого набора C_2—C_6-субстратов (этанол, ацетат, пируват, C_4-дикарбоновые кислоты, моно- и дисахариды, меласса, крахмал) [1—3]. При разработке подходов к интенсификации образования этого ЭПС на среде со смесью этанола и глюкозы нами были сделаны следующие наблюдения. При культивировании продуцента на глюкозосодержащей среде с использованием посевного материала, выращенного на этаноле, наблюдали ускорение роста бактерий и увеличение количества синтезированных

Обозначений: АСБ — абсолютно сухая биомасса; ОП — оптическая плотность; ЭПС — экзополисахарид(ы).

* Для переписки.

ЭПС по сравнению с параметрами, полученными при использовании инокулята, выращенного на среде с глюкозой [4]. В этой же работе было показано, что при использовании посевного материала, выращенного на среде с этанолом, повышается количество ЭПС при последующем росте продуцента на смешанном субстрате (этанол+глюкоза), а также выход ЭПС относительно биомассы и субстрата. В то же время, при применении инокулята, выращенного на глюкозосодержащей среде, эти показатели снижаются. Механизмы, обусловливающие повышение синтеза ЭПС в зависимости от способа приготовления посевного материала, остались неисследованными.

Известно, что продолжительность лаг-фазы при периодическом культивировании микроорганизмов зависит от предшествующих условий культивирования [5, 6]. Так, если источники углерода и энергии в новой среде отличаются от тех, что были в предшествующей среде, приспособление к новым условиям может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались. С целью снижения продолжительности лаг-фазы и сокращения длительности процессов при получении посевного материала и производственной ферментации используют, как правило, среды с одинаковым источником углерода.

Целью настоящей работы было исследовать зависимость синтеза этаполана на различных субстратах от природы источника углерода в среде для получения инокулята, а также выяснить механизмы, обусловливающие повышение синтеза ЭПС при различных способах получения посевного материала.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований являлся штам *Acinetobacter* sp. — продуцент комплексного полисахаридного препарата этаполана, описанный нами ранее [1—4]. Штамм депонирован в Украинской коллекции микроорганизмов под номером В-7005.

Культивирование *Acinetobacter* sp. В-7005. Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава, г/л: (*среда А*) KH_2PO_4 — 6,8, KOH — 1,8, 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; (*среда Б*) KH_2PO_4 — 3,4, KOH — 0,9, 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. Емкость фосфатного буфера в средах *А* и *Б* составляла соответственно 0,05 М и 0,025 М. В среды дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0006 пантотената кальция.

В качестве источника углерода и энергии пользовали ацетат калия в концентрации 1,6%, э нол в концентрации 1,0 об.%, глюкозу в концент ции 1,0%, а также смесь этанола и глюкозы в со ношении 1:1 (об./масса). При выращивании бак рий на смешанном субстрате концентрация эта ла составляла 0,5 и 1 об.%, глюкозы — 0,5 и 1 Содержание ацетата калия в среде (1,6%) соответ вовало по содержанию углерода концентрац этанола 1,0 об.%. Ацетат калия вносили в сред виде 20%-ного раствора.

Культивирование бактерий осуществля также на среде, содержащей 1% глюкозы, в ко рую дополнительно вносили этанол в концент ции 0,01 об.%.

Acinetobacter sp. культивировали в колб на качалке (220 об/мин) при 30° и pH 6,8—7,0 в чение 16—96 ч.

В качестве посевного материала использо ли культуру в экспоненциальной фазе (16—2 роста), выращенную на среде *А* с различными точниками углерода: этанол — 0,5 об.%; глюкоза 0,5%; ацетат — 0,8%. Концентрация посевного териала составляла 5% от объема инокулируем среды.

Концентрацию биомассы определяли по тической плотности клеточной суспензии с по дующим пересчетом на АСБ по калибровочно графику. Показатели синтеза этаполана (колич во синтезированных ЭПС, выход ЭПС от субс та и ЭПС-синтезирующую способность) изм ли, как описано в работе [4]. Концентрацию ац та в культуральной жидкости определяли энз тически с использованием ацетаткиназы [7].

Получение бесклеточных экстракт При получении бесклеточных экстрактов *Ac tobacter* sp. В-7005 осуществляли предварит ную ультразвуковую обработку культураль жидкости, содержащей бактериальные клетк ЭПС. Применение такого приема обусловл тем, что вязкий этаполан с высокой молекуляр массой практически невозможно отделить от ток щадящими методами. (Именно по этой пр не в предыдущих работах для проведения энз логических исследований использовали мут ный штамм 1НГ, не образующий ЭПС [3, 4]). К туральную жидкость в экспоненциальной ф роста *Acinetobacter* sp. В-7005 обрабатывали (22 кГц) в течение 60 с, после чего центрифуг вали (5000 g, 10 мин, 4°). Осадок клеток три отмывали от остатков среды и ЭПС 0,05 трис-HCl-буфером (pH 7,0) с последующим

Таблица

Зависимость синтеза этаполана на различных субстратах от природы источника углерода в среде при получении посевного материала

Источник углерода в среде для получения посевного материала, %	Источник углерода в среде культивирования	ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы
Глюкоза, 0,5	Глюкоза, 1,0 %	4,0	2,67
	Этанол, 1,0 об.%	3,9	2,48
	Глюкоза, 0,5 % + этанол, 0,5 об.%	5,4	3,86
	Глюкоза, 1,0 % + этанол, 1,0 об.%	7,85	3,57
Этанол, 0,5	Глюкоза, 1,0 %	5,6	4,15
	Этанол, 1,0 об.%	4,2	2,60
	Глюкоза, 0,5 % + этанол, 0,5 об.%	6,0	4,00
	Глюкоза, 1,0 % + этанол, 1,0 об.%	8,35	3,98
Ацетат калия, 0,8	Глюкоза, 1,0 %	5,65	4,53
	Этанол, 1,0 об.%	4,95	2,75
	Глюкоза, *0,5 % + этанол, 0,5 об.%*	*6,3*	*4,30*
	Глюкоза, 1,0 % + этанол, 1,0 об.%	*9,15*	*4,58*
	Ацетат калия, 1,6 %	4,4	2,80

Примечание: культивирование осуществляли на среде *А*.

снижении емкости буфера в этанолсодержащей среде культивирования *Acinetobacter* sp. было установлено нами ранее [14]. Использование ацетатного инокулята (вместо этанольного) для синтеза этаполана на смеси этанола и глюкозы позволило повысить количество синтезированного ЭПС и его выход по отношению к биомассе и субстрату как на среде *А*, так и на среде *Б* (см. табл. 2). При этом конечное значение *pH* культуральной жидкости на обоих средах составляло 6,8—6,85, в культуральной жидкости отсутствовал ацетат. Следует отметить, что применение ацетатного посевного материала при получении этаполана на среде *Б* позволяло достичь практически таких же показателей синтеза ЭПС, как и в случае этанольного инокулята на среде *А* (см. табл. 2).

Таблица

Образование этаполана на среде, содержащей смесь этанола и глюкозы (1 об.% + 1 %) в зависимости от источника углерода в среде для получения посевного материала

Среда культивирования	Источник углерода в среде для выращивания посевного материала, %	$pH_{кон}$	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы	Выход ЭПС от заданного субстрата, %
А	Этанол, 0,5	6,65	2,10	8,35	3,98	46,4
	Ацетат калия, 0,8	6,85	2,00	9,15	4,58	50,8
Б	Этанол, 0,5	6,05	2,25	5,60	2,55	31,1
	Ацетат калия, 0,8	6,80	1,95	7,40	[illegible]	[illegible]

Примечание: состав сред *А* и *Б* указан в разделе «Условия эксперимента».

Следующий этап наших исследований был посвящен выяснению причин, обусловливающих повышение синтеза ЭПС при различных способах получения посевного материала.

В работах [3, 4] нами было высказано следующее предположение: при выращивании *Acinetobacter* sp. на среде с глюкозой из этанольного инокулята или при внесении в среду с глюкозой минорных концентраций C_2-соединений увеличение синтеза ЭПС может быть обусловлено одной и той же причиной: присутствие C_2-соединений в среде с глюкозой может индуцировать глюконеогенез. В пользу такого механизма интенсификации синтеза ЭПС свидетельствовали и полученные ранее данные энзиматических исследований: при наличии низких концентраций этанола или ацетата в среде с глюкозой активность изоцитратлиазы — фермента, восполняющего пул C_4-дикарбоновых кислот, предшественников глюконеогенеза — повышалась почти в 15 раз по сравнению с активностью данного фермента при выращивании на среде с глюкозой [3]. В табл. 3 приведены данные по активности ферментов центрального метаболизма и глюконеогенеза при выращивании бактерий на средах с этанолом и глюкозой и различных способах получения посевного материала. Ранее нами было показано, что у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на среде с этанолом, синтез фосфоенолпирувата обеспечивается двумя ключевыми ферментами глюконеогенеза — PEP-карбоксикиназой и PEP-синтетазой, соотношение которых менялось при переходе бактерий из экспоненциальной в стационарную фазу роста [15].

Как видно из данных, представленных в табл. 3, при использовании этанольного или ацетатного инокулята для посева в глюкозосодержащую среду или при внесении в среду с глюкозой минорных концентраций этанола наблюдали снижение активности изоцитратдегидрогеназы и увеличение активности ферментов глиоксилатного цикла (изоцитратлиазы и малатсинтазы), а также PEP-синтетазы — одного из ключевых ферментов глюконеогенеза по сравнению с их активностью в случае применения глюкозного посевного материала. При этом активность остальных исследуемых ферментов практически не изменялась. Таким образом, приведенные в настоящей работе результаты энзиматических исследований подтвердили наше предположение об индукции глюконеогенеза при выращивании *Acinetobacter* sp. на глюкозе в присутствии C_2-соединений.

Таблица 3

Влияние способа приготовления посевного материала на активность ферментов цикла трикарбоновых кислот, анаплеротических путей и глюконеогенеза при выращивании *Acinetobacter* sp. B-7005 на средах с этанолом и глюкозой

Источник углерода при получении посевного материала, %	Источник углерода в среде культивирования, %	Активность, нмоль/мин·мг белка										
		Пируватдегидрогеназа	Аконитатгидратаза	Изоцитратдегидрогеназа	2-Оксоглутарат-дегидрогеназа	Сукцинатдегидрогеназа	Фумараза	Малатдегидрогеназа	Малатсинтаза	Изоцитратлиаза	Пируваткарбоксилаза	PEP-синтетаза
Этанол, 0,5	Этанол, 0,5	Н.о.	268,0	630,0	93,4	137,5	186,8	193,4	171,2	165,5	Н.о.	1029,0
	Глюкоза, 0,5	102,1	563,3	1008,3	411,3	208,3	174,2	210,8	64,3	54,5	300,3	586,0
Ацетат, 0,8	Глюкоза, 0,5	98,7	496,1	954,6	426,0	189,7	165,3	188,6	59,3	60,4	299,6	602,4
Глюкоза, 0,5	Глюкоза, 0,5	112,3	700,4	1410,9	448,5	200,1	189,4	219,3	2,8	5,4	304,4	0
	Глюкоза, 1,0 + этанол, 0,01	107,6	489,7	895,8	398,5	187,4	165,3	195,2	50,4	60,4	312,4	513,2

Примечания: культивирование осуществляли на среде *А*; н.о. — не определяли.

Наблюдаемое лимитирование метаболизма ацетата и снижение показателей синтеза ЭПС при культивировании продуцента этаполана на среде *Б*, содержащей этанол и глюкозу, с использованием этанольного инокулята (см. табл. 2) можно объяснить двумя причинами: ингибированием активности ацетил-КоА-синтетазы продуктами окисления этанола (NADH и NADPH), как показано нами ранее [14], а также ингибированием синтеза этого фермента глюкозой, как это установлено для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Bacillus subtilis* [16, 17]. В работе [14] было показано, что при росте *Acinetobacter* sp. B-7005 на среде с этанолом реакция, катализируемая ацетил-КоА-синтетазой, является скорость-лимитирующей, т.е. в клетках бактерий ацетат образуется с более высокой скоростью, чем вовлекается в дальнейший метаболизм. Избыток ацетата выделяется в культуральную жидкость, обусловливая снижение pH. Наличие буфера в среде *А* снижает эффект накопления ацетата в отношении pH. Исходя из этого ясно, что при значениях pH, близких к нейтральному, ацетат вновь транспортируется в клетки бактерий и вовлекается в метаболизм [14]. При снижении емкости буфера (среда *Б*) поступление ацетата в культуральную жидкость вызывает более заметные изменения pH и снижение показателей синтеза ЭПС.

Литературные данные свидетельствуют о том, что ацетил-КоА-синтетаза, функционирующая в клетках многих про- и эукариот, являетс индуцибельным ферментом [18, 19]. Известн что одним из индукторов синтеза ацетил-КоА-си тетазы является ацетат [20]. Таким образом, впо не вероятно, что применение посевного матери ла, выращенного на ацетате, для культивировани *Acinetobacter* sp. B-7005 на смеси этанола и глюк зы позволяет частично устранить репрессиру щее влияние глюкозы на синтез ацетил-КоА-си тетазы, а также снять ингибирующее действи продуктов окисления этанола на активность этог фермента. Следовательно, увеличение синтеза ЭП в этом случае (см. табл. 1) можно объяснить пов шением как активности, так и синтеза ацетил-К А-синтетазы.

В табл. 4 приведены данные по определ нию активности некоторых ферментов C_2-мет болизма при выращивании бактерий на среде, с держащей этанол или смесь этанола и глюкозы зависимости от способа приготовления инокул та. При культивировании бактерий на среде с эт нолом и использовании ацетатного посевного м териала наблюдали повышение активности исс дуемых ферментов (ацетил-КоА-синтетазы, из цитратлиазы и малатсинтазы) по сравнению с активностью при применении этанольного ино лята. Использование этанольного посевного ма риала при выращивании продуцента этаполана среде *Б*, содержащей этанол и глюкозу, сопров

Таблица 4

Влияние способа приготовления посевного материала на активность ключевых ферментов C_2-метаболизма при выращивании *Acinetobacter* sp. B-7005 на среде с этанолом, а также смесью этанола и глюкозы

Источник углерода при получении посевного материала, %	Источник углерода в среде культивирования, %	Активность, нмоль/мин·мг белка			
		Ацетил-КоА-синтетаза	Ацетаткиназа	Изоцитрат-лиаза	Малат-синтаза
Этанол, 0,5	Этанол, 1,0	130,9	18,9	130,0	123,6
Ацетат калия, 0,8		180,3	20,1	178,4	167,3
Этанол, 0,5	Этанол, 1,0 + глюкоза, 1,0	85,2	15,7	19,7	37,5
Этанол, 0,5	Этанол, 1,0 + глюкоза, 1,0*	65,4	10,1	9,3	15,6
Ацетат калия, 0,8		120,4	17,4	18,9	32,3

* Культивирование осуществляли на среде *Б*

далось снижением активности ферментов C_2-метаболизма по сравнению с их активностью при росте бактерий на среде *А*. Однако культивирование *Acinetobacter* sp. B-7005 на среде со смесью субстратов на среде *Б* с использованием ацетатного инокулята способствовало высокой активности исследуемых ферментов. Таким образом, энзимологические исследования (в частности, данные по активности ацетил-КоА-синтетазы) могут свидетельствовать о том, что использование посевного материала, выращенного на ацетате, позволяет устранить лимитирование метаболизма ацетата при культивировании *Acinetobacter* sp. B-7005 на этаноле, а также смеси этанола и глюкозы.

Механизмы, обусловливающие повышение активности ацетил-КоА-синтетазы в этом случае, могут быть различными: прямое влияние ацетата на активность этого фермента и возможность индукции ацетатом его синтеза, а также другие, отличные от индукции, механизмы регуляции на уровне синтеза фермента (действие ацетата как активатора катаболитных генов, т.е. активация транскрипции, отличная от индукции; влияние на процессы аттенуации, образование альтернативного σ-фактора и др.) [21].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что синтез микробного экзополисахарида этаполана зависит от природы источника углерода в среде при получении посевного материала. Использование инокулята, выращенного на средах, содержащих C_2-субстраты (этанол, ацетат), сопровождается повышением синтеза этаполана на среде с глюкозой, что обусловлено стимуляцией глюконеогенеза.

Показана возможность увеличения синтеза этаполана при культивировании на среде, содержащей этанол или смесь этанола и глюкозы при использовании посевного материала, полученного с использованием ацетата. В таких условиях наблюдается повышение активности ацетил-КоА-синтетазы и ферментов глиоксилатного цикла, что может свидетельствовать об устранении лимитирования метаболизма ацетата. Применение посевного материала, выращенного на среде с ацетатом, позволяет реализовать получение этаполана на среде с этанолом и глюкозой, буферная емкость которой снижена в два раза, без снижения показателей синтеза ЭПС. Это дает возможность сократить расход компонентов на приготовление питательной среды и, таким образом, существенно снизить себестоимость конечного продукта.

Получено 16.07.04

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э.* Микробный синтез экзополисахаридов на C_1-C_2-соединениях. — Киев: Наукова думка, 1992. — 212 с.
2. *Пирог Т.П.* Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. Дисс... д-ра биол. наук. — Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999. — 450 с.
3. *Пирог Т.П., Коваленко М.А, Кузьминская Ю.В.* // Микробиология. — 2002. — Т. 71. — № 2. — С. 215—221.
4. *Пирог Т.П., Коваленко М.А, Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П.* // Микробиология. — 2003. — Т. 72. — № 1. — С. 26—32.
5. *Шлегель Г.* Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 566 с.
6. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
7. *Криштаб Т.П., Соколов И.Г.* // Микробиол. журнал. — 1985. — Т. 47. — № 1. — С. 86—88.
8. *Pearce, J., Carr, N.G.* // J. Gen. Microbiol. — 1967. — V. 49. — N. 2. – P. 301—313.
9. *Kitto, G.B.* Methods in enzymology / Ed. J.M. Lowenstein. — New York and London: Acad. Press, 1969. — V. XIII. — P. 106—116.
10. *O'Brien, R.W., Stern, J.R.* // J. Bacteriol. — 1969. — V. 98. — N. 2. — P. 388—393.
11. *O'Brien, R.W., Geisler, J.* // J. Bacteriol. — 1974. — V. 119. — N. 3. — P. 661—665.
12. *Cooper, R.A., Kornberg, H.L.* Methods in enzymology / Ed. J.M. Lowenstein. — New York and London: Acad. Press, 1969. — V. XIII. — P. 309—314.
13. *Bradford, M. M* // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P. 248—254.
14. *Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.* // Прикл. биохим. микробиол. — 2003. — Т. 39. — № 2. — С. 180—188.
15. *Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.* // Микробиология. — 2003. — Т. 72. — № 4. — С. 459—465.
16. *Grundy, F.J., Turinsky, A.J., Henkin, T.M.* // J. Bacteriol. — 1994. — V. 176. — N. 15. — P. 4527—4533.
17. *Kratzer, S., Schuller, H.J.* // Gene. — 1995. — V. 161. — N. 1. — P. 75—79.
18. *Brasen, C., Schonheit, P.* // Arch. Microbiol. — 2001. — V. 175. — N. 5. — P. 360—368.
19. *De Virgilio, C., Burckert, N., Barth, G., et al.* // Yeast. — 1992. — V. 8. — N. 12. — P. 1043—1051.
20. *Kumari, S., Tishet, R., Eisenbach, M., Wolfe, A.J.* // J. Bacteriol. — 1995. — V. 177. — N. 10. — P. 2878—2886.
21. *Kumari, S., Beatty, C.M., Browning, D.F., et al.* // J. Bacteriol. — 2000. — V. 182. — N. 15. — P. 4173—4179.

T.P. PIROG[1,2,*], Yu.V. KORZH[2], and N.V. LASHCHUK[1]

[1] National University of Food Technologies, *01033*, Kiev Ukraine

[2] Institute for Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, *03143*, Kiev Ukraine

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Effect of Way for Inoculum Preparation on the Exopolysaccharide Ethapolane Synthesis

The microbial exopolysaccharide (EPS) ethapolane synthesis by *Acinetobacter* sp. on different substrates (ethanol, acetate, glucose, glucose + ethanol) has been investigated as a function of a method for inoculum preparation. The increase in the EPS synthesis on a medium with glucose using the inoculum grown on ethanol or acetate was caused by the gluconeogenesis induction. This was confirmed by an increase in the activities of glyoxylate cycle enzymes (isocitrate lyase and malate synthase) and a key enzyme of gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate synthetase. Use of the inoculum grown on acetate for culturing *Acinetobacter* sp. on ethanol or a mixture of ethanol and glucose was accompanied with the following evidence. The limitations in acetate metabolism in the bacteria were eliminated, the activities of acetyl-CoA synthetase, isocitrate lyase, malate synthase grew, and the EPS synthesis augmented. Possible mechanisms of the enhanced acetyl-CoA synthetase activity using the inoculum grown on acetate are discussed.

Key words: biosynthesis, C_2-metabolism, gluconeogenesis, glyoxylate cycle, method for inoculum preparation, microbial exopolysaccharides.

* Author for correspondence