

Пирог, Т.П. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле / Т. П. Пирог, Ю. В. Кузьминская // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 4. – С. 459–465.

УДК 579.841: 577.15

ОСОБЕННОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ШТАММА *Acinetobacter* sp., РАСТУЩЕГО НА ЭТАНОЛЕ

Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук
Украины, Киев*

В клетках выращенного на этаноле мутантного штамма *Acinetobacter* sp. 1НГ, не образующего экзополисахарида, определена активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и некоторых биосинтетических путей.

Несмотря на наличие обоих ключевых ферментов глиоксилатного цикла (изоцитратлиазы и малатсинтазы) у *Acinetobacter* sp. функционирует полный ЦТК, который выполняет преимущественно биосинтетическую роль. Об этом свидетельствовала высокая активность изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42.), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2. и КФ 1.4.1.4.) и низкая активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2.).

При росте *Acinetobacter* sp. на этаноле образование пирувата происходит в оксалоацетатдекарбоксилазной реакции (КФ 4.1.1.3.), а синтез фосфоенолпирувата (ФЕП) обеспечивается двумя ключевыми ферментами глюконеогенеза – ФЕП-карбоксикиназой (КФ 4.1.1.49.) и ФЕП-синтазой (КФ 2.7.9.1.), соотношение которых менялось при переходе бактерий из экспоненциальной в стационарную фазу роста.

При внесении в этанолсодержащую среду C_4 -дикарбоновых кислот (фумарата калия) в 1,5-2 раза увеличивалась активность ферментов глиоксилатного цикла, а также фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2.), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37. и КФ 1.1.1.82.) и ФЕП-синтазы. Более заметным (почти в 7,5 раз) было повышение в этих условиях ФЕП-карбоксикиназной активности.

Полученные результаты являются основой для усовершенствования технологии получения микробного экзополисахарида этаполана на C_2 -субстратах.

Ключевые слова: метаболизм этанола, цикл трикарбоновых кислот, глиоксилатный цикл, глюконеогенез, биосинтез.

Штамм *Acinetobacter sp.* 12S является продуцентом комплексного полисахаридного препарата (ЭПС) этаполана [1]. Ранее нами были начаты исследования C_2 -метаболизма у данных бактерий с использованием мутантного штамма *Acinetobacter sp.* 1НГ, не образующего ЭПС [2]. Клетки исходного ЭПС-образующего штамма не могли быть использованы для проведения энзимологических исследований ввиду невозможности их отделения от высоковязкого ЭПС с высокой молекулярной массой. Установлено, что окисление этанола до ацетальдегида у *Acinetobacter sp.* катализируется НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназой. Акцепторами электронов в ацетальдегиддегидрогеназной реакции являются НАД⁺ и НАДФ⁺. Ацетат вовлекается в метаболизм *Acinetobacter sp.* при участии ацетил-КоА-синтетазы. Наличие изоцитратлиазы свидетельствовало о том, что анаплеротической последовательностью реакций, восполняющих пул C_4 -дикарбоновых кислот в клетках *Acinetobacter sp.*, является глиоксилатный цикл.

Цель настоящей работы – дальнейшее изучение C_2 -метаболизма у *Acinetobacter sp.* В задачу исследований входило определение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и ферментов некоторых биосинтетических путей (в частности, глюконеогенеза). Полученные результаты энзиматических исследований будут являться основой для разработки новых подходов к регуляции синтеза этаполана с заданными физико-химическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследований являлся мутантный штамм бактерий *Acinetobacter sp.* 1НГ, не образующий ЭПС [3].

Культивирование *Acinetobacter sp.* 1НГ. Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 3,4; KOH – 0,9; NH_4NO_3 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001. В среду дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0009%

пантотената кальция. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1% (по объему), а также смесь этанола (1%) и fumarата калия (0,2%). Fumarат калия вносили в среду культивирования бактерий в виде 10%-ного раствора. В одном из вариантов осуществляли выращивание *Acinetobacter sp.* 1НГ на среде с этанолом и fumarатом, не содержащей пантотеновой кислоты.

В качестве посевного материала использовали суточную культуру, выращенную на смешанной агаризованной среде: мясо-пептонный агар (МПА) и сусло-агар (СА) в соотношении 1:1, а также культуру из экспоненциальной фазы (16-18 ч роста), выращенную на минеральной среде указанного выше состава, содержащей 0,5% (по объему) этанола. Концентрация посевного материала составляла 5% от объема засеваемой среды.

Acinetobacter sp. 1НГ культивировали в колбах на качалке (220 об/мин) при 30°C, pH 6,8-7,0 в течение 16 - 40 ч.

Определение скорости окисления субстратов интактными клетками *Acinetobacter sp.* 1 НГ. Скорость дыхания интактных клеток *Acinetobacter sp.* в присутствии этанола, ацетальдегида, ацетата, а также органических кислот цикла Кребса определяли по скорости потребления кислорода в реакционной смеси полярографически при помощи электрода закрытого типа на полярографе ППТ-1, как описано в работах [2, 4]. Концентрация субстратов составляла 10 мМ. Для определения скорости окисления органические кислоты использовали в виде калиевых солей.

Для проведения полярографических исследований клетки *Acinetobacter sp.* 1НГ, полученные после культивирования в жидкой минеральной среде (16-20 часов, экспоненциальная фаза роста), дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин., 4°C). Для инкубации клеток при определении скорости окисления субстратов использовали трис-фосфатный буфер (0,05 М, pH 7,0).

Энзиматические анализы. Получение бесклеточных экстрактов осуществляли, как описано в работах [2, 4]. Отмывание и разрушение клеток проводили в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (pH 7,0).

Активность ключевых ферментов C_2 -метаболизма: НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1.), НАДФ⁺-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.4), ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1.), ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1.), а также 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2.), пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1.) определяли, как описано в работах [2, 4].

Активность малатсинтазы (КФ 4.1.3.2.) определяли колориметрически по убыли фенилгидразона глиоксилата при 324 нм [5].

Активность изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41.) [6], малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37) [7], глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2.) [8] определяли спектрофотометрически по восстановлению НАД⁺, а изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42.) [9] и малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.82.) [10] – по восстановлению НАДФ⁺ при 340 нм.

Активность цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7.) анализировали по убыли ацетилфосфата в присутствии коэнзима А и оксалоацетата, как описано в работе [9]. Активность аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3.) [11], фосфоенолпируваткарбоксикиназы (КФ 4.1.1.49) [12], фосфоенолпируватсинтазы (пируват, ортофосфат-дикиназы) (КФ 2.7.9.1.) [13], оксалоацетатдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.3.) [11] определяли спектрофотометрически по окислению НАДН, а глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4.) [14] – по окислению НАДФН при 340 нм. Активность фосфоенолпируватсинтазы анализировали также колориметрически по снижению концентрации пирувата в реакционной смеси (реакция с динитрофенилгидразином) при 445 нм [13].

Активность малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей оксалоацетат) (КФ 1.1.1.38 и КФ 1.1.1.40.) определяли по восстановлению НАД⁺ и НАДФ⁺ соответственно при 340 нм, как описано в работе [4].

Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1.) определяли по восстановлению дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата при 600 нм [11]. Активность фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2.) анализировали спектрофотометрически по образованию или потреблению фумарата при 315 нм [11].

Активность ферментов определяли при температуре 28-30°C, оптимальной для роста *Acinetobacter sp.*, и выражали в нмоль/мин мг белка. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Bradford [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение скорости дыхания в присутствии органических кислот ЦТК выращенных на этаноле интактных клеток *Acinetobacter sp.* 1 НГ показало, что бактерии способны окислять все исследуемые субстраты, причем скорость окисления органических кислот (за исключением фумарата) была практически одинаковой и составляла 100-140 нмоль O₂/мин мг клеток (табл.1). Скорость дыхания клеток в присутствии фумарата была ниже - 77,5 нмоль O₂/мин мг клеток. Полученные результаты свидетельствовали о функционировании у данных бактерий при росте на этаноле полного ЦТК, что было подтверждено энзимологическими исследованиями (табл. 2).

При культивировании микроорганизмов на углеводных субстратах ЦТК является основным источником НАДН, последующее окисление которого генерирует АТФ у аэробных гетеротрофов. Кроме того, ЦТК служит источником ряда интермедиатов, необходимых в конструктивном метаболизме [16]. При росте *Acinetobacter sp.* на этаноле первые реакции окисления этого субстрата, осуществляемые НАД⁺-зависимыми дегидрогеназами, являются энергодающими, а восполнение пула С₄-дикарбоновых кислот обеспечивается за счет глиоксилатного цикла, ключевыми ферментами которого являются изоцитратлиаза и малатсинтаза. Окисление малата до оксалоацетата осуществляется НАД⁺ и НАДФ⁺-зависимыми ферментами (табл. 2). Таким образом, функционирование полного (неразомкнутого на уровне 2-

оксоглутаратдегидрогеназы) ЦТК у этих бактерий не является обязательным. Однако в бесклеточном экстракте *Acinetobacter sp.* обнаружена достаточно высокая активность всех ферментов этого цикла (табл. 2). Несколько ниже была активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы. Обращает на себя внимание особенно высокий уровень изоцитратдегидрогеназной активности (у *Acinetobacter sp.* выявлена только НАДФ⁺-зависимая активность этого фермента).

Известно, что у бактерий поток изоцитрата через глиоксилатный цикл регулируется путем ковалентной модификации (фосфорилирования - дефосфорилирования) изоцитратдегидрогеназы под действием бифункциональной киназы/фосфатазы [17, 18]. Показано, что при росте энтеробактерий на С₂-субстратах изоцитратдегидрогеназа фосфорилируется, и ее активность заметно снижается, в то время как увеличивается активность изоцитралиазы [18]. Высокая активность как изоцитратдегидрогеназы, так и изоцитратлиазы при культивировании *Acinetobacter sp.* на этаноле может свидетельствовать о том, что ЦТК у этих бактерий выполняет преимущественно биосинтетическую роль, как это установлено для ряда метилотрофных бактерий [16].

Для определения роли ЦТК в С₂-метаболизме *Acinetobacter sp.* исследовали активность глутаматдегидрогеназы – фермента, осуществляющего восстановительное аминирование α-кетоглутарата и принимающего участие в синтезе аминокислот глутаматного семейства [19]. В бесклеточном экстракте *Acinetobacter sp.* обнаружена высокая как НАДФ⁺-, так и НАД⁺-зависимая глутаматдегидрогеназная активность (табл. 2). Оказалось интересным, что активность глутаматдегидрогеназы, измеренная в направлении биосинтеза глутамата, была достаточно высокой, однако практически не выявлялась в реакциях дезаминирования. Аналогичное явление было обнаружено для НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы у цианобактерий *Spirulina platensis* [20]. Полученные нами результаты подтвердили биосинтетическую функцию ЦТК при росте *Acinetobacter sp.* на этаноле.

При ассимиляции микроорганизмами двух- или трехуглеродных субстратов (пируват, лактат, этанол, ацетат) либо субстратов, катаболизм которых протекает через ацетил-КоА или интермедиаты ЦТК (высшие *n*-алканы, жирные кислоты, ароматические соединения), возникает необходимость синтеза молекул углеводов, необходимых для образования нуклеиновых кислот, полисахаридов, а также ряда метаболитов. Эти превращения осуществляются путем глюконеогенеза [16, 19].

Способность *Acinetobacter sp.* расти и синтезировать ЭПС на C₂-C₃-субстратах [1] свидетельствует о высокой активности у данных бактерий глюконеогенетической ветви обмена веществ. У большинства микроорганизмов ключевым ферментом глюконеогенеза является фосфоенолпируват-карбоксикиназа, катализирующая АТФ-зависимое превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват (ФЕП) [16, 19]. Обнаруженная в бесклеточном экстракте *Acinetobacter sp.* ФЕП-карбоксикиназная активность была невысокой и не превышала 40-50 нмоль/мин мг белка (табл. 2), причем активность данного фермента существенно не изменялась при замене АТФ на ГТФ или ИТФ.

Следует отметить, что при глюконеогенезе прямого образования фосфоенолпирувата из пирувата в пируваткиназной реакции не происходит, так как эта реакция практически необратима в силу того, что для превращения пирувата в ФЕП требуется свободная энергия, а следовательно, равновесие реакции сдвинуто влево [19]. Однако у бактерий образование ФЕП из пирувата может происходить непосредственно, но в результате реакции, катализируемой фосфоенолпируватсинтазой, при которой из одной молекулы АТФ образуется молекула АМФ, а не АДФ [19, 21, 22]. Поскольку при гидролизе АТФ до АМФ и неорганического фосфата высвобождается больше свободной энергии, такая реакция является термодинамически возможной.

Энзимологические исследования показали, что при росте на этаноле у *Acinetobacter sp.* в образовании ФЕП принимают участие оба ключевых фермента глюконеогенеза – ФЕП-карбоксикиназа и ФЕП-синтаза (табл. 2 и 3). Соотношение активности этих ферментов изменялось при переходе бактерий из

экспоненциальной в стационарную фазу роста (табл. 3). Активность ФЕП-синтазы была практически одинаковой как в середине экспоненциальной, так и в начале стационарной фазы, а ФЕП-карбоксикиназная активность повышалась более, чем в 10 раз при переходе культуры в стационарную фазу роста.

Известно, что у *Escherichia coli* ФЕП-синтаза катализирует превращение пирувата в ФЕП при росте на пирувате, а при выращивании на сукцинате в клетках этих бактерий функционирует ФЕП-карбоксикиназа [22]. Оказалось интересным, что активность ФЕП-синтазы выявлена у *E. coli* при росте не только на глюконогенетических субстратах, но и на глюкозе [21]. Наличие этого фермента приводит к функционированию в клетках «пустого» цикла между ФЕП и пируватом. Показано, что при увеличении ФЕП-синтазной активности повышается соотношение ФЕП/пируват, благодаря чему активизируется работа ФЕП-фосфотрансферазной системы, что в конечном итоге приводит к увеличению потребления глюкозы и стимуляции катаболизма этого субстрата [21].

Дальнейшие эксперименты показали, что при культивировании *Acinetobacter sp.* на C_2 -субстратах образование пирувата осуществляется из оксалоацетата в оксалоацетатдекарбоксилазной реакции (табл. 2). Пируват входит в состав этаполана – полисахарида, синтезируемого *Acinetobacter sp.* [1], а также является предшественником синтеза аминокислот пируватного семейства [16, 19]. В бесклеточном экстракте не выявлена активность НАДФ⁺-зависимой малатдегидрогеназы, декарбоксилирующей оксалоацетат (“malic”-фермента), а активность НАД⁺-зависимого “malic”-фермента была невысокой и составляла 15-20 нмоль/мин мг белка. Оказалось интересным, что при культивировании бактерий на этаноле была обнаружена достаточно высокая активность пируваткарбоксилазы (табл. 2). Известно, что этот фермент катализирует карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата [23]. В литературе имеются также немногочисленные сведения о способности этого фермента осуществлять декарбоксилирование оксалоацетата. [24, 25]. Вполне вероятно, что у бактерий *Acinetobacter sp.* при выращивании на этаноле

пируваткарбоксилаза также принимает участие в образовании пирувата (наряду с оксалоацетатдекарбоксилазой). Наши исследования показали, что при переходе культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста пируваткарбоксилазная активность увеличивалась более, чем в три раза и составляла 589,4 нмоль/мин мг белка. Однако на сегодняшний день физиологическая роль этого фермента при росте бактерий на C_2 -субстратах остается неясной, и изучению данного вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

На основании результатов энзимологических исследований схема метаболизма этанола у *Acinetobacter sp.* может быть представлена в следующем виде (рисунок).

Ранее [1] нами была установлена возможность интенсификации синтеза ЭПС *Acinetobacter sp.* за счет внесения в среду C_4 -дикарбоновых кислот – интермедиатов метаболизма этанола, вовлекаемых в глюконеогенез. Показано, что при дробном внесении фумарата калия (порциями по 0,2%) в среду с этанолом в стационарной фазе роста бактерий происходило стехиометрическое превращение его в ЭПС. При этом количество синтезированных ЭПС увеличивалось в 4-5 раз и составляло 10-15 г/л, а выход ЭПС от использованного субстрата (этанол+фумарат) достигал 80%. В связи с этим представлялось интересным исследовать изменение активности ферментов глюконеогенеза при выращивании бактерий на среде с этанолом и фумаратом.

При внесении фумарата в среду, содержащую этанол и пантотеновую кислоту, активность большинства исследованных ферментов повышалась в 1,5-2 раза (табл. 2). Примечательно, что при выращивании бактерий на этаноле и фумарате увеличивалась активность ферментов глиоксилатного цикла, восполняющего пул C_4 -дикарбоновых кислот – предшественников глюконеогенеза, а также и ферментов глюконеогенеза (в частности, активность ФЕП-карбоксикиназы была почти в 7,5 раз выше, чем на этаноле).

При отсутствии пантотеновой кислоты в среде, содержащей этанол и фумарат, малатсинтазная активность уменьшалась более, чем в 2 раза, и

существенно (более, чем в 25 раз) снижалась активность изоцитратлиазы, однако увеличивалась изоцитратдегидрогеназная активность (табл. 2). Следует отметить, что даже при отсутствии пантотеновой кислоты в среде с этанолом и фумаратом активность ферментов глюконеогенеза (ФЕП-карбоксикиназы и ФЕП-синтазы) была выше, чем на среде с этанолом и пантотенатом без внесения С₄-дикарбоновой кислоты (табл. 2).

Скорость дыхания в присутствии фумарата, малата и изоцитрата интактных клеток, выращенных на этаноле и фумарате, была также выше, чем у клеток с этанолсодержащей среды (табл. 1). Скорость окисления этанола, ацетальдегида и ацетата интактных клеток, полученных при культивировании бактерий на этаноле, этаноле и фумарате в присутствии пантотеновой кислоты была одинаковой; при отсутствии пантотената в среде наблюдали снижение скорости окисления ацетата (табл. 1).

Таким образом, в результате проведенных энзимологических и полярографических исследований установлено, что при выращивании *Acinetobacter sp.* на этаноле в клетках бактерий функционирует как глиоксилатный цикл, так и полный цикл трикарбоновых кислот. Образование углеводов осуществляется в реакциях глюконеогенеза, пирувата – в оксалоацетатдекарбоксилазной, а глутамата – в глутаматдегидрогеназной реакции. Культивирование бактерий на среде с этанолом и фумаратом сопровождалось повышением активности ферментов глиоксилатного цикла и исследованных биосинтетических путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на С₁-С₂-соединениях. Киев: Наук. думка, 1992. 212 с.
2. Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малашенко Ю.Р. Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter sp.*, не образующего экзополисахариды // Микробиология. 2002. 71. № 2. С. 222-229.
3. Пирог Т.П., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter sp.*, не образующих экзополисахариды // Микробиология. 2000. 69. N 5. С. 674-680.
4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование

экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter sp.* и особенности его C₆-метаболизма // Микробиология. 2002. 71. № 2. С. 215-221.

5. *Pearce J., Carr N.G.* The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans* // J. Gen. Microbiol. 1967. 49. N 2. P. 301-313.

6. *Kornberg A.* Isocitric dehydrogenase of yeast (DPN) // In: Methods in enzymology (Ed. *Colowick S.P.* and *Kaplan N.O.*). New York: Acad. Press, 1955. Vol. 1. P. 707-709.

7. *Kitto G.B.* Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart // In: Methods in enzymology (Ed. *Lowenstein J.M.*). New York and London: Acad. Press, 1969. Vol. XIII. P. 106-116.

8. *Strecker H.J.* L-glutamic dehydrogenase from liver // In: Methods in enzymology (Ed. *Colowick S.P.* and *Kaplan N.O.*). New York: Acad. Press, 1955. Vol. II. P. 220-225.

9. *O'Brien R.W., Stern J.R.* Requirement for sodium in the anaerobic growth of *Aerobacter aerogenes* on citrate // J. Bacteriol. 1969. 98. N 2. P. 388-393.

10. *Johnson H.S., Hatch M.D.* Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and "malic" enzyme in plants with the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis // Biochem. J. 1970. 119. N 2. P. 273-280.

11. *O'Brien R.W., Geisler J.* Citrate metabolism in *Aerobacter cloacae* // J. Bacteriol. 1974. 119. N 3. P. 661-665.

12. *Huei-Che Chang, Lane M.D.* The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase // J. Biol. Chem. 1966. 241, N 10. P. 2413-2420.

13. *Cooper R.A., Kornberg H.L.* Phosphoenolpyruvate synthetase // In: Methods in enzymology (Ed. *Lowenstein J.M.*). New York and London: Acad. Press, 1969. Vol. XIII. P. 309-314.

14. *Martinez-Bilbao M., Martinez A., Urkijo I., Llama M.J., Serra J.L.* Induction, isolation and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum* // J. Bacteriol. 1988. 170. N 10. P. 4897-4902.

15. *Bradford M. M.* A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 72. P. 248-254.

16. *Малашенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А.* Микробный метаболизм неростовых субстратов. Киев: Наук. думка, 1987. 192 с.

17. *Nimmo H.G., Borthwick A.C., Mansi E.M., Holms W.H., MacKintosh C., Nimmo G.A.* Regulation of the enzymes at the branchpoint between the citric acid cycle and the glyoxylate bypass in *Escherichia coli* // Biochem. Soc. Symp. 1987. 54. P. 93-101.

18. *Cozzone A.J.* Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1998. 52. P. 127-164.

19. *Дэгли С., Никольсон Д.* Метаболические пути. М.: Мир, 1973. 310 с.

20. Менджул М.И., Лысенко Т.Г., Шаинская О.А., Бусахина И.В. Изучение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот цианобактерии *Spirulina platensis* // Микробиол. журнал. 2000. 62. № 1. С. 3 – 10.

21. Patnaik R., Roof W.D., Young R.F., Liao J.C. Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle // J. Bacteriol. 1992. 174. N 23. P. 7527-7532.

22. Chao Y.P., Patnaik R., Roof W.D., Young R.F., Liao J.C. Control of gluconeogenic growth by pps and pck in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1993. 175. N 21. P. 6939-6944.

23. Jitrapakdee S., Wallace J.C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase // Biochem. J. 1999 V. 340 P.1–16.

24. Scrutton M.C., Utter M.F. Pyruvate carboxylase. III. Some physical and chemical properties of the highly purified enzyme // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. N 1. P. 1-9.

25. Attwood P.V., Cleland W.W. Decarboxylation of oxaloacetate by pyruvate carboxylase // Biochemistry. 1986. V. 25. N 25. P. 8191-8196.