

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI

**TOIMETISED**

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ

ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

624

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА  
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СУБСТРАТА  
У МИКРООРГАНИЗМОВ

Труды по микробиологии

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ  
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS  
ALUSTATUD 1893.a. ВІСНІК 624 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893.г.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА  
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СУБСТРАТА  
У МИКРООРГАНИЗМОВ

Труды по микробиологии

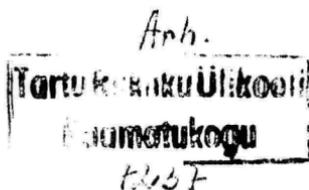


ТАРТУ 1982

Редакционная коллегия:

Х. Мийдла, Л. Вийлеберг, Я. Симискер.

Ответственный редактор: Л. Вийлеберг



© Тартуский государственный университет, 1982

Ученые записки Тартуского государственного университета.

Выпуск 624.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО  
СУБСТРАТА У МИКРООРГАНИЗМОВ.

Труды по микробиологии.

На русском языке.

На русском языке.

Резюме на английском языке.

Тартуский государственный университет.

СССР, 202400 г.Тарту, ул.Пяясоэли, 18.

Ответственный редактор Л. Вийлеберг.

Корректоры И. Пауска, И. Каар.

Подписано к печати 3.12.1982.

ИВ 09384.

Формат 60x90/16.

Бумага писчая.

Машинопись. Ротапринт.

Учетно-издательских листов 6,88.

Печатных листов 8,0.

Тираж 300.

Заказ № 1283.

Цена 1 руб.

Типография ТГУ, СССР, 202400, г.Тарту, ул.Пяясоэли, 14.

## СОДЕРЖАНИЕ

Я. Симискер, Э. Хейнару, Т. Ныгес. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у метанолусваивающих дрожжей <i>Candida boidinii</i> .....	5
J. Simisker, E. Heinaru, T. Nõges. The effect of methanol concentration on the rate of its assimilation and respiration by the methanol growing yeast <i>Candida boidinii</i> . Summary.....	20
Р. Кыйвээр, Н. Пеэт, Я. Симискер. Динамика активности алкогольоксидазы, дыхания и скорости усвоения метанола в клеточном цикле дрожжей .....	21
R. Kõiveer, N. Peet, J. Simisker. Fluctuations in alcohol oxidase activity, respiration and assimilation rate in the cell-cycle of yeasts. Summary ...	35
А. Кахру, Т. Аламяэ. Пути энергетического использования метанола у дрожжей <i>Pichia pinus</i> .....	36
A. Kahru, T. Alamäe. Pathways of energetic utilization of methanol in yeasts. Summary.....	47
Т. Аламяэ, Х. Тэугяс. Влияние различных источников углерода на образование ферментов метаболизма метанола у <i>Pichia pinus</i> .....	48
T. Alamäe, H. Teugjas. Effects of carbon source of the formation of enzymes of methanol metabolism in <i>Pichia pinus</i> . Summary .....	59
Х. Тэугяс, Р. Кангур. Определение метанола при помощи алкогольоксидазы .....	60
H. Teugjas, R. Kangur. Estimation of methanol by alcohol oxidase. Summary .....	66
И. Хенно, Л. Кухлберг, Э. Талпсел. Влияние источника углерода на образование ферментов катаболизма энергетического субстрата у денитрификаторов .....	67

I. Henno, L. Kuhlberg, E. Talpsep. Effect of carbon source on the formation of catabolizing enzymes in denitrifying bacteria. Summary .....	79
Л. Касак, А. Хейнару. Генетическая и биохимическая нестабильность штаммов бактерий с плазмидами биодегградации, контролирующих окисление нафталина и салициловой кислоты .....	80
L. Kasak, A. Heinaru. Instability of degradative plasmid-borne genetical and biochemical characteristics in pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate. Summary.....	95
А. Хейнару, А. Мяэ. Новый тип деградационных плазмид у <i>Alcaligenes paradoxus</i> определяющих у бактерии способность роста на агарозе .....	96
A. Heinaru, A. Mäe. A new type of degradative plasmids in strains of <i>alcaligenes paradoxus</i> encoding the ability of bacteria to grow on agarose. Summary.....	III

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТАНОЛА НА СКОРОСТЬ ЕГО УСВОЕНИЯ  
И ДЫХАНИЯ У МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЕЙ  
*CANDIDA BOYDII*

Я. Симискер, Э. Хейнару и Т. Ныгес

Эффективность использования метанола дрожжами существенно зависит от концентрации метанола в среде. В проточных культурах при высоких скоростях разбавления параллельно с появлением в среде остаточного метанола и формальдегида наблюдается уменьшение выхода биомассы на единицу использованного субстрата (Held et al., 1978). Окисление внеклеточного формальдегида, образующегося из метанола при его высоких концентрациях, не сопряжено с синтезом АТФ и клеточного вещества, что и является одной из причин уменьшения эффективности использования метанола (Pilat, Prokop, 1975; Schlanderer et al., 1975; Held et al., 1978).

Непосредственные данные о влиянии концентрации метанола на скорость его ассимиляции и окисления отсутствуют, а данные о зависимости скорости роста дрожжей от концентрации метанола неоднозначны. Значения  $K_s$  по метанолу у дрожжей варьируются в больших пределах — 0,04 ... 21 мМ (Sahm, Wagner, 1972; Pilat, Prokop, 1975; Кувшинников и др., 1978), что трудно объяснить штаммовыми различиями, так как ферментативный аппарат метаболизма метанола у дрожжей весьма универсальный и практически не зависит от вида (Sahm, 1977). Во многих работах (Asthana et al., 1971; Sahm, Wagner, 1973; Volfova, 1976) найденные значения  $K_s$  для метанола у целых клеток на порядок выше, чем  $K_m$  для метанола первого фермента метаболизма метанола — алкогольоксидазы — 0,23 ... 2,0 мМ (Tani et al., 1972; Sahm, 1975; Kato et al., 1976). Такое низкое сродство клеток метанолусваивающих дрожжей к метанолу не имеет удовлетворительного объяснения.

В настоящей работе мы поставили себе целью оценить сродство клеток метанолусваивающих дрожжей к метанолу и эффективность его использования по скорости усвоения  $^{14}\text{C}$ -метано-

ла дыхания при различных концентрациях субстрата.

### Методика

Метанолусваивающие дрожжи *Candida boidinii* КТ-1 и *Pichia pinus* К-2 из коллекции ВНИИ генетики выращивали в трехлитровых колбах при постоянной аэрации продуванием культур стерильным воздухом. Среда культивирования содержала (в г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 0,1 и следующие микроэлементы (в мг/л):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,22;  $\text{MnSO}_4$  - 1,81;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,079;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 2,86;  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$  - 1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 9,3;  $\text{CaCl}$  - 1,2;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,2; трилон Б - 10. Перед посевом в среду добавляли метанол в количестве 5 мл на 1 л. За развитием культур наблюдали по измерению оптической плотности при 623 нм.

Скорость усвоения метанола измеряли у суспензии клеток по включению  $^{14}\text{C}$  из метанола в клеточное вещество. Для приготовления суспензии клетки выделяли из среды центрифугированием при  $+4^\circ$ , дважды отмывали свежей питательной средой, не содержащей источника углерода, ресуспендировали в той же среде и суспензию сохраняли при  $+4^\circ$ .

Непосредственно перед введением  $^{14}\text{C}$ -метанола суспензию инкубировали в течение 10 мин при постоянной аэрации при  $30^\circ$ . Конечный объем инкубационной смеси составлял 3 мл и содержал 0,1 ... 0,5 мг сухого вещества клеток в мл в зависимости от опыта. Через точно измеренные промежутки времени из суспензии отбирали пробы по 0,2 мл. Клетки отделяли от среды фильтрованием суспензии через мембранный фильтр "Синпор" с диаметром пор 0,3 мкм, охлажденный до  $0^\circ$ . На фильтрах клетки промывали ледяной дистиллированной водой и затем для приостановления метаболических процессов были заморожены жидким азотом. Замороженные клетки фиксировали в парах концентрированной  $\text{HCl}$  в течение 10 мин. Фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы, содержащие 5 мл сцинтилляционной смеси (4 г ППО и 0,4 ПОПОП в 1л диоксана). Радиоактивность фильтров измеряли на сцинтилляционном счетчике Ультрабета - 1210. Контрольными опытами установили, что потери радиоактивности при фильтрации и промывании клеток не превышают 0,5% от усвоенного  $^{14}\text{C}$ -метанола.

Для измерения интенсивности дыхания суспензий клеток использовали амперометрический метод определения кислорода при

помощи платинового электрода типа Кларка, вмонтированного в ячейку с конструкцией, предложенной Шольцом и Островским (1975). Термостатированная полярографическая ячейка объемом 1,5 мл содержала питательную среду без источника углерода, 0,1 ... 0,5 мг сухих клеток в мл и метанол с разными конечными концентрациями 0,1 ... 5,0 мМ. Перед введением метанола измеряли эндогенное дыхание. Активность алкогольоксидазы определяли по Тани (Tani et al., 1972). Инкубационная смесь содержала: метанол - 33,3 мМ, фосфатный буфер, pH 7,5 - 50 мМ и бесклеточный экстракт. Образующийся формальдегид определяли ацетилацетоном (Nash, 1953). Для получения бесклеточного экстракта клетки выделяли из среды центрифугированием при 4000g в течение 15 мин и дважды промывали 0,05 М фосфатным буфером. Промытые клетки разрушали прессом Хьюджа при 35°. Клеточные осколки удаляли центрифугированием при 16000g в течение 30 мин при 4°. Удельную активность фермента выражали в единицах активности на 1 мг белка. Белок в бесклеточных экстрактах определяли по методу Лоури (Lowry, et al., 1951).

#### Результаты и обсуждение

Включение  $^{14}\text{C}$  из метанола в клеточное вещество при использовании суспензии с низкой плотностью имело прямопропорциональную зависимость от времени в течение 7 ... 10 мин (рис. 1), что указывает на сохранение условий стационарности в опыте.

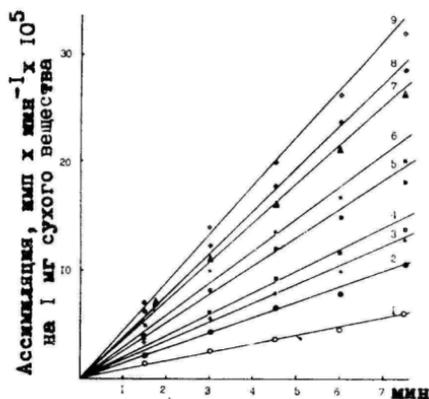


Рис. 1. Кинетика включения  $^{14}\text{C}$ -метанола в клеточное вещество при различных концентрациях метанола у 10-часовой культуры *Candida boidinii*.

Концентрации метанола, мМ: 1 - 0,1; 2 - 0,2; 3 - 0,25; 4 - 0,3; 5 - 0,4; 6 - 0,5; 7 - 0,75; 8 - 1,0; 9 - 2,0

Результаты опытов, представленные на рисунках 2 ... 5 показывают, что зависимость усвоения метанола от его концентрации имеет сложный характер и определяется физиологическим состоянием клеток. У клеток из начала логарифмической фазы роста кривые зависимости  $v$  от  $[S]$  приближаются к типичным гиперболическим кривым ферментативных реакций, описываемым уравнением Михаэлиса - Ментена (рис. 2)

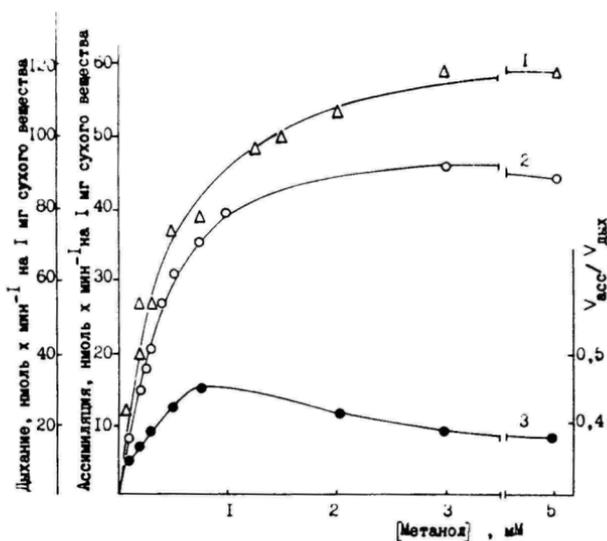


Рис. 2. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания клеток *S. boidinii* из начала логарифмической фазы роста культуры.

1 - дыхание; 2 - усвоение метанола; 3 - отношение  $V_{асс} / V_{дых}$ .

Но у клеток из середины и конца логарифмической фазы роста форма кривых  $v$  от  $[S]$  отклоняется от гиперболических (рис. 3...5). Последнее выражается в следующем: во-первых,

нмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup> на 1 мг сухого вещества

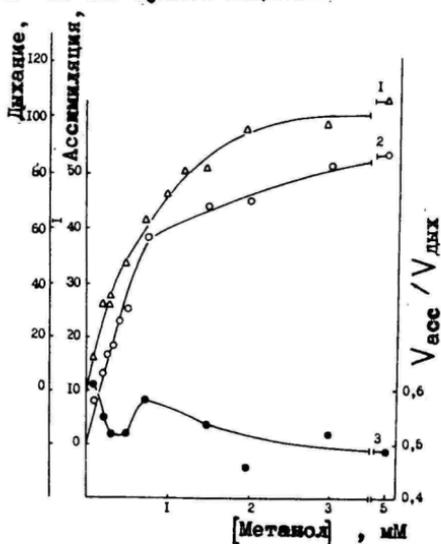


Рис. 3. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания клеток *S. boydii* из середины логарифмического роста культуры.

1 - дыхание; 2 - ассимиляция метанола; 3 - отношение  $V_{асс} / V_{дых}$

начало кривых принимает S-образную форму (рис. 4 и 5); во-вторых, выход кривых на плато при насыщающих концентрациях происходит под резким уклоном (рис. 3 и 4); в-третьих, у клеток из второй половины логарифмической фазы роста при низких концентрациях субстрата (0,05...0,25) обнаруживается положительный кооперативный эффект метанола на скорость его усвоения, а на кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  - промежуточное плато (рис. 5).

Все указанные отклонения формы кривых зависимости  $v$  от  $[S]$  от гиперболических являются характерными для кинетики реакций, катализируемых аллостерическими ферментами.

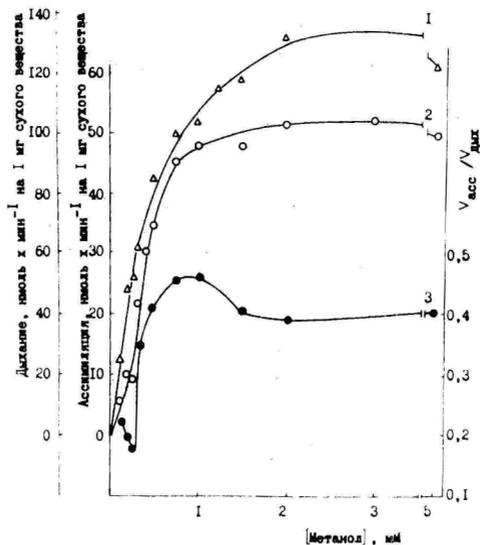


Рис. 4. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у клеток *C. boidinii* из конца логарифмической фазы роста культуры.

1 - дыхание; 2 - ассимиляция метанола; 3 - отношение  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$

Исходя из принципа узкого места кривые зависимости  $V$  от  $[S]$ , полученные у целых клеток, должны характеризовать кинетику реакции, лимитирующей скорость процесса. Следовательно, наличие нескольких типов кинетических кривых показывает, что скорость усвоения метанола в зависимости от состояния клеток лимитируется различными ферментами, один из которых обладает, по-видимому, аллостерическими свойствами.

Вопрос о лимитирующих реакциях усвоения метанола у дрожжей не нашел окончательного решения. В проточных культурах *Hansenula polymorpha* содержание алкогольоксидазы в клетках увеличивается параллельно с уменьшением скорости потока, т.е. концентрации метанола в среде. Учитывая последний факт

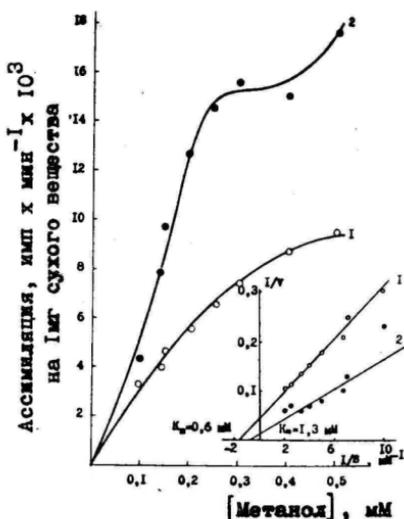


Рис. 5. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения у клеток *C. boidinii* из начала (1) и середины (2) логарифмической фазы роста.

и низкое сродство алкогольоксидазы к метанолу, Ван Дайкен предположил, что скорость роста культур определяется скоростью окисления метанола алкогольоксидазой (van Dijken et al., 1976).

Кажущиеся значения  $K_m$  для метанола, лимитирующие скорость реакции его усвоения у клеток *Candida boidinii* из начала логарифмической фазы роста, варьировались в наших опытах в пределах 0,6...1,3 мМ (рис.5), которые весьма близки к значениям  $K_m$  для метанола у алкогольоксидазы. Клетки из начала логарифмической фазы роста характеризуются низкой активностью алкогольоксидазы (рис. 6), и не исключено, что последняя лимитирует скорость ассимиляции метанола у этих клеток.

Алкогольоксидаза не является аллостерическим ферментом и ее кинетические свойства не объясняют отклонения формы кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  у клеток из второй половины и конца логарифмической фазы роста от гиперболической.

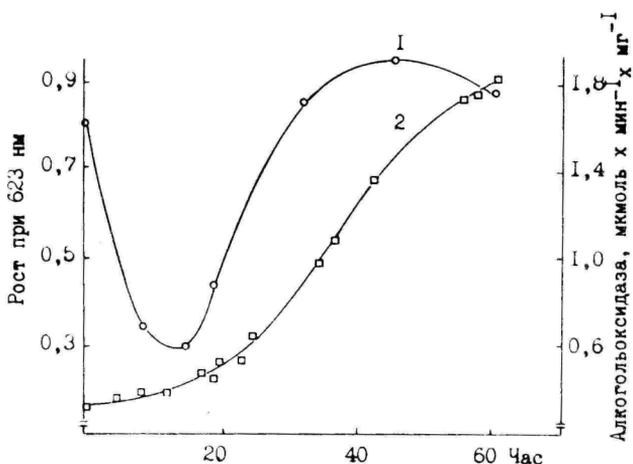


Рис. 6. Динамика роста (2) и активности алкоголь-оксидазы (1) периодической культуры *Candida boidinii*.

Недавно обнаружены аллостерические свойства у одного из ферментов усвоения формальдегида - киназы дигидроксиацетона (Hofmann, Vabel, 1980). В опытах *in situ* у этого фермента выявлено положительное кооперативное взаимодействие с АТФ, и на кривых зависимости  $v$  от  $[АТФ]$  имеется промежуточное плато. Аналогичные отклонения формы кривых зависимости  $v$  от  $[S]$  усвоения метанола обнаружены нами у клеток с высоким содержанием алкогольоксидазы из второй половины и конца логарифмической фазы роста (рис. 3...5). Возможно, что у этих клеток скорость усвоения метанола определяется киназой дигидроксиацетона, и рассмотренные выше особенности кинетических кривых усвоения метанола отражают активацию киназы дигидроксиацетона АТФ и аденилатным зарядом.

Но не исключено, что положительный кооперативный эффект метанола на скорость его усвоения у клеток с высоким содержанием алкогольоксидазы объясняется своеобразной упаковкой этого фермента в пероксисомах. Можно предположить, что параллельно с увеличением в среде концентрации метанола увеличивается количество алкогольоксидазы, участвующей в реак-

ции, что и ведет к непропорциональному нарастанию скорости усвоения метанола при увеличении его концентрации. В связи с этим интересно отметить, что по данным цитохимического окрашивания алкогольоксидаза в кристаллическом ядре перокси-сом менее доступна для субстратов, чем в аморфном матриксе ( Veenhuis et al., 1978).

Одной из причин появления промежуточных плато на кривых зависимости  $v$  от  $[S]$  ферментативных реакций является наличие в системе двух форм фермента, из которых один имеет положительное кооперативное взаимодействие с субстратом, а скорость другого зависит от концентрации субстрата гиперболически (рис. 5). Промежуточное плато образуется здесь в результате наложения двух типов кривых зависимости  $v$  от  $[S]$ .

Появление промежуточного плато на кривых зависимости  $v$  от  $[S]$  усвоения метанола суспензиями клеток указывает, по-видимому, на наличие в суспензиях нескольких типов клеток, различающихся между собой по степени кинетической кооперативности с субстратом. Причиной гетерогенности клеток дрожжей может являться преобразование ферментативного аппарата усвоения метанола в клеточном цикле (Симискер и др., 1980; Кийвезер и др., 1982).

Максимальная скорость усвоения метанола достигается, как правило, при концентрации метанола  $0,7...1,0$  мМ (рис. 2...5). Эта концентрация значительно ниже, чем можно было ожидать по многим данным  $K_s$ , определенным по скорости роста (Asthana et al., 1971; Sahm, Wagner, 1973; Volfova, 1976).

Скорость дыхания, измеренная по скорости поглощения кислорода, гиперболически зависит от концентрации метанола независимо от стадии развития культуры. Максимальная скорость дыхания достигается при несколько более высоких концентрациях метанола ( $1,0...2$  мМ), чем скорость усвоения метанола. Следовательно, характер зависимости скорости усвоения метанола и скорости дыхания несколько различаются между собой.

Увеличение скорости дыхания в ответ на повышение концентрации метанола выше  $1,0...2,0$  мМ без соответствующего увеличения скорости усвоения метанола ведет, по-видимому, к уменьшению энергетической эффективности использования метанола в результате его бесполезного окисления. Для характеристики эффективности усвоения метанола при различных его концентрациях мы использовали отношение  $v_{acc}/v_{дых}$ . Это отношение будет тем больше, чем эффективнее используется ме-

танол для синтеза клеточного вещества. Вычисленное по суммарному уравнению использования метанола в проточной культуре *Candida boidinii* вариант 60 с выходом биомассы 0,32 г на один г использованного субстрата это отношение равняется 0,38 (Held et al., 1978), и 0,5 для хемостатной культуры *Hansenula polymorpha* с выходом биомассы 0,38 г (van Dijken et al., 1976). Независимо от стадии развития культур, из которых были выделены клетки, максимальные значения отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  наблюдаются в весьма узких пределах концентрации метанола (0,7...1,0 мМ), т.е. при тех же концентрациях, при которых кривые зависимости  $v$  от  $[S]$  ассимиляции метанола выходят на плато (рис. 2...3). Это позволяет предположить, что реакции окисления метанола и реакции образования клеточного вещества могут быть энергетически сопряжены с максимальной эффективностью только в узких пределах концентрации субстрата в среде. В этих условиях в зависимости от стадии развития культур численное значение отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  составляет 0,4...0,6. Увеличение концентрации метанола в среде выше 1 мМ или уменьшение ниже 0,7...0,5 мМ вызывает резкое уменьшение отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$ .

Интересно, что у клеток с высокой активностью алкоголь-оксидазы из середины и из конца логарифмической фазы роста культур при увеличении концентрации метанола от 0,1...0,25 мМ скорость дыхания увеличивается сильнее, чем скорость усвоения метанола, и отношение  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  уменьшается (рис. 3 и 4). Минимальное значение отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  у этих клеток наблюдается при 0,3 мМ метанола.

Причины низкого значения отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  при лимитирующих концентрациях метанола не имеют однозначного объяснения. Уменьшение выхода биомассы при низких скоростях разбавления в проточных культурах объясняется увеличением доли энергии, которую клетки тратят на поддержание. По литературным данным, затраты на поддержание у дрожжей при росте на среде с метанолом составляют до 8...12 нмоль метанола на мг клеточного вещества в минуту (van Dijken et al., 1976; Кувшинников и др., 1978). Максимальная скорость усвоения метанола в анализируемых опытах достигла только 40...60 нмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup> и уменьшение скорости ассимиляции метанола при лимитирующих концентрациях метанола должно вести к заметному уменьшению эффективности его использования. Но у хе-

мостатных культур выход биомассы, как правило, остается постоянным в широком диапазоне разбавления (van Dijken et al., 1976; Held et al., 1978). Однако в указанных выше работах отсутствуют данные о точной концентрации метанола в среде при различных скоростях роста, что осложняет сопоставление этих данных с результатами, представленными в настоящей работе. Надо также иметь в виду, что кратковременные опыты с суспензиями клеток не должны отражать все особенности растущих культур.

Уменьшение отношения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  при повышении концентрации метанола выше 1 мМ вызвано, в основном, увеличением скорости дыхания без соответствующего увеличения скорости его усвоения (рис. 2...4), что, по-видимому, указывает на усиление окисления метанола без энергетического сопряжения.

Предполагаемыми причинами уменьшения выхода биомассы при высоких концентрациях метанола является окисление избыточного формальдегида алкогольоксидазой (Sahm, 1975) и каталазой (van Dijken et al., 1975) и (или) уменьшение эффективности фосфорилирования в митохондриях (Schlanderer et al., 1975).

Характерной особенностью клеток *Candida boidinii* из периодических культур является достижение максимальной скорости дыхания при сравнительно низких концентрациях метанола (1...2 мМ). Стабилизация скорости дыхания в указанном интервале концентрации наблюдается как у клеток с низкой, так и высокой активностью алкогольоксидазы (рис. 7). Значение  $K_m$  лимитирующего скорость дыхания реакции у суспензии клеток *Candida boidinii* составляет примерно 1,7 мМ, что весьма близко к значению  $K_m$  алкогольоксидазы. При концентрации метанола выше 3 мМ наблюдается уже некоторое подавление скорости дыхания. Это позволяет предположить, что у клеток *Candida boidinii* имеются механизмы, которые препятствуют усилению окисления метанола при концентрациях, насыщающих скорость его усвоения.

По этой особенности клетки из периодических культур, которые были использованы в наших опытах, существенно отличаются от клеток *Hansenula polymorpha*, растущих в хемостатной культуре с низкой скоростью роста. У последних потенциальная скорость дыхания многократно превышает реальные требования клеток в соответствующих условиях и достигается при более

высоких концентрациях метанола - до 150 мМ (van Dijken et al., 1976).

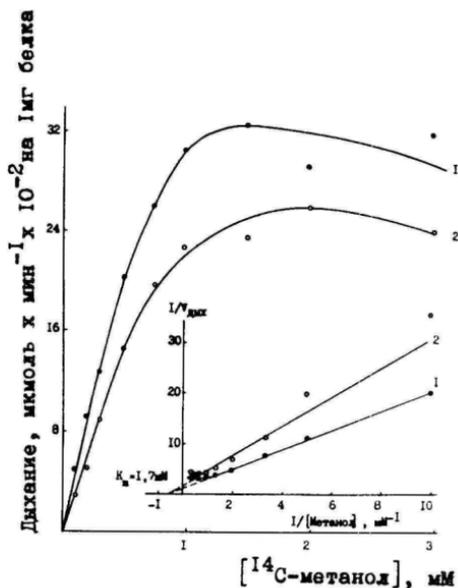


Рис. 7. Влияние концентрации метанола на скорость дыхания у клеток *C. boidinii* с различной активностью алкогольоксидазы. Внутри результаты представлены в координатах Лайнуивера - Берка. Активность алкогольоксидазы (мкмоль x мин<sup>-1</sup> x мг<sup>-1</sup>) 1 - 2,19 и 2 - 1,34.

Достижение максимальной скорости дыхания при сравнительно низких концентрациях метанола (1...2 мМ) в наших опытах, очевидно, не является результатом лимитирования дыхания концентрацией кислорода в среде. Полярнографические кривые поглощения кислорода сохраняли прямо пропорциональную зависимость от времени при всех концентрациях метанола и уменьшение растворенного кислорода от 100...95-процентного насыщения до 60...40-процентного не оказывало влияния на форму кривых.

Представленные выше данные показывают, что клетки метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* обладают весьма вы-

соким сродством к метанолу как в отношении ассимиляции метанола, так и в отношении дыхания на среде с метанолом. Значения  $K_m$  лимитирующих скорости реакции ассимиляции метанола и дыхания не превышают значения  $K_m$  алкогольоксидазы и не исключено, что сродство клеток дрожжей к метанолу определяется в основном этим ферментом. Учитывая свойства метанола, его проникновение через клеточную мембрану не требует активного транспорта и окисление метанола в необратимой реакции при помощи алкогольоксидазы ведет к созданию нужного для диффузии градиента концентрации. Однако сложный характер кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  ассимиляции метанола у клеток с высокой активностью алкогольоксидазы показывает, что скорость усвоения метанола в этих клетках определяется, вероятно, регуляторным ферментом, обладающим аллостерическими свойствами.

#### Заключение

У метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* исследовано влияние концентрации метанола на скорости его усвоения и дыхания у клеток из различных стадий развития периодических культур. Показано, что скорость усвоения метанола у клеток из начала логарифмической фазы роста с низкой активностью алкогольоксидазы зависит от концентрации метанола гиперболически, а у клеток с высокой активностью алкогольоксидазы из второй половины и конца логарифмической фазы роста форма кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  усвоения метанола отклоняется от гиперболического.

Дыхание клеток *Candida boidinii* независимо от стадии развития культур зависит от концентрации метанола гиперболически. Максимальная скорость дыхания клеток достигается при несколько более высоких концентрациях метанола, около  $1...2$  мМ, чем максимальная скорость усвоения метанола — около  $0,7...1$  мМ. Судя по значениям отношения  $V_{асс}/V_{дых, окисл}$ , окисление метанола может быть с максимальной эффективностью сопряжено с его усвоением только в узком интервале концентрации субстрата, отвечающего на кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  ассимиляции перегибу кривых на плато.

Предполагается, что скорость усвоения метанола в зависимости от стадии развития культур определяется либо алкогольоксидазой, либо каким-то регуляторным ферментом усвоения формальдегида, обладающим аллостерическими свойствами.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

- Кувшинников В.Д., Воробьев А.В., Ерошин В.К., Минкевич И.Г. Изучение эффективности и удельной скорости роста дрожжей *Hansenula polymorpha* на метаноле при непрерывном культивировании. - Прикл. биохимии и микробиол., 1978, т. 14, с. 366 - 372.
- Кыйвээр Р., Пеат Н., Симискер Я. Динамика активности алкогольоксидазы, дыхания и скорости усвоения метанола в клеточном цикле дрожжей. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиол., 3, с. 21-35.
- Симискер Я.А., Кыйвээр Р.К., Таллсеп Э.А. Гетерогенность клеток метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* по содержанию алкогольоксидазы. - Микробиология, 1980, т. 49, с. 847 - 849.
- Шольц К.Ф., Островский Д.Н. Ячейка для амперометрического определения кислорода. - В кн.: Методы современной биохимии. - М.: Наука, 1975, с. 52 - 58.
- Asthana, H., Humphrey, A.E., Moritz, V. Growth of yeast on methanol as the carbone substrate. - Biotechn. Bioeng., 1971, v. 13, p. 923 - 929.
- Dijken, J.P., van. Otto, R., Harder, W. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by catalase purified from methanol-grown *Hansenula polymorpha*. - Arch. Microbiol., 1975, v. 106, p. 221 - 226.
- Dijken, J.P., van, Otto, R., Harder, W. Growth of Hansenula polymorpha in a methanol-limited chemostat. - Arch. Microbiol., 1976, v. 111, p. 137 - 144.
- Held, W., Schlanderer, G., Reimann, J., Dellweg, H. Continuous culture of Candida boidinii variant 60 growing on methanol. - Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1978, v. 6, p. 127 - 132.
- Hofmann, K.H., Babel, W. Dihydroxyacetone kinase of methanolassimilating yeasts. I. Regulation of dihydroxy - acetone kinase from Candida methylica in situ. - Z. Allg. Mikrobiol., 1980, Bd. 20, S. 389 - 398.
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., Ogata, K. Alcohol oxidase of Kloeckera sp. and Hansenula polymorpha. Catalytic pro-

- erties and subunit structures. - Eur. J. Biochem., 1976, v. 64, p. 341 - 350.
- Lowry, O.N., Rosenbrough, A., Farr, K., Randall, K. Protein measurement with Folin phenol reagent. - J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265 - 275.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. - Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416 - 421.
- Pilat, P., Prokop, A. The effect of methanol, formaldehyde and formic acid on growth of Candida boidinii 11 Bh. Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, p. 1717 - 1728.
- Sahm, H. Oxidation of formaldehyde by alcohol oxidase of Candida boidinii. - Arch. Microbiol., 1975, v. 105, p. 179 - 181.
- Sahm, H. Metabolism of methanol by yeasts. - In: Advances in biochemical engineering 6 (Eds.: Ghose, T.K., Fiechter, A., Blakebrough, V.), Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1977, p. 77 - 103.
- Sahm, H., Wagner, F. Mikrobielle Verwertung von Methanol Isolierung und Charakterisierung der Hefe Candida boidinii. - Arch. Mikrobiol., 1972, v. 84, p. 29 - 42.
- Sahm, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. The ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. - Eur. J. Biochem., 1973, v. 36, p. 250 - 256.
- Schlanaerer, G., Diel, F., Held, W., Dellweg, H. Ein Beitrag zum Methanol-Stoffwechsel und seiner Regulation in Hefen. - In: Symposium mikrobielle Proteingewinnung, (Herausgeber F. Wagner), Weinheim: Verlag Chemie, S. 25 - 33.
- Tani, J., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast, Kloeckera sp. No. 2201. - Agr. Biol. Chem., 1972, v. 36, p. 68 - 75.
- Veenhuis, M., Dijken, J.F., van, Pilon, S.A.F., Harder, W. Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast Hansenula polymorpha and its relation to environmental conditions. - Arch. Microbiol., 1978, v. 117, p. 153 - 163.
- Volfova, O. Methanol-oxidizing enzymes. - Folia Microbiol., 1976, v. 21, p. 206.

THE EFFECT OF METHANOL CONCENTRATION ON THE RATE OF  
ITS ASSIMILATION AND RESPIRATION BY THE METHANOL  
GROWING YEAST CANDIDA BOIDINII

J. Simisker, E. Heinaru, T. Nõges

S u m m a r y

The effect of methanol concentration on the rate of its assimilation and respiration by cells grown on methanol was examined in cells in different phases of growth. It was found that the maximum rate of respiration was reached at higher methanol concentrations (1...2mM) than the maximum rate of methanol assimilation (0.7...1mM). The oxidation of methanol with the maximum efficiency of methanol assimilation could be observed only at a narrow concentration range. In graphic representations of the relationship between the methanol assimilation rate and the substrate concentration this range of maximum methanol assimilation falls upon the curve segment before the curve reaches the plateau.

Our data suggest that different methanol assimilation rates in different growth phases are determined either by alcohol oxidase activity or by some regulatory enzyme of allosteric properties in the formaldehyde assimilation pathway.

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ, ДЫХАНИЯ И  
СКОРОСТИ УСВОЕНИЯ МЕТАНОЛА В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ  
ДРОЖЕЙ

Р. Кыйвеэр, Н. Пеэт, Я. Симискер

Результаты исследования динамики алкогольоксидазы в клеточном цикле дрожжей позволяют предположить, что при переходе дрожжей к почкованию происходит частичная инактивация алкогольоксидазы (Симискер и др., 1980, 1982). Инактивация алкогольоксидазы также имеет место при резком увеличении скорости потока в непрерывных культурах с низкой скоростью роста (Veenhuis et al., 1980). Причиной инактивации фермента в последнем случае считают накопление формальдегида в питательной среде. Механизмы инактивации алкогольоксидазы в настоящее время не выяснены.

Методика

Методика культивирования метанолусваивающих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* КТ - I приведена в работе Симискера и других (1983). Синхронные культуры получили по Мичисон (Mitchison, Vincent, 1965). В качестве стартовой культуры использовали фракцию мелких клеток, выделенную из асинхронно растущей культуры центрифугированием клеток в градиенте плотности сахарозы. В некоторых опытах для получения гомогенной фракции мелких клеток градиент сахарозы (от 20% до 40%) был заменен градиентом верографина от 7% до 19%.

Методики определения скоростей дыхания и усвоения метанола, а также методика получения бесклеточных экстрактов и определения активности алкогольоксидазы приведены в работе Симискера и других (1982). Определение содержания белка в бесклеточных экстрактах провели по Лоури (Lowry et al., 1951). Содержание ДНК в клетках определяли с дифениламином (Giles, Myers, 1965). Для построения калибровочной кривой использовали бычий ДНК из тимуса. Для определения ДНК промытые дистиллированной водой

клетки дважды обрабатывали 8 мл 0,5 молярной перхлорной кислотой при 0° в течение 30 мин для экстракции метаболитов. Гидролиз нуклеиновых кислот проводили при 70° в течение 20 мин в 0,5 молярной перхлорной кислоте. Негидролизуемый остаток удаляли центрифугированием и повторно обрабатывали с 0,5 молярной перхлорной кислотой при 70°. К гидролизату добавляли 0,1 мл концентрированной серной кислоты и объем раствора доводили до 2 мл. Затем к гидролизату добавляли 2 мл 4% дифениламина в ледяной уксусной кислоте и 0,1 мл раствора ацетальдегида с концентрацией 1,6 мкг/мл. Пробы инкубировали в течение 10 часов при 30° и ДНК определяли по оптической плотности при 595 нм.

Содержание формальдегида в среде определяли ацетилацетоном (Nash, 1953). Общее число клеток и число почкующихся клеток определяли микроскопически.

#### Результаты и обсуждение

Наши ранние исследования динамики активности алкогольоксидазы в синхронно растущих культурах *Candida boidinii* показали, что во время максимумов почкования происходит резкое уменьшение активности алкогольоксидазы в клетках (Симискер и др., 1980, 1982). Для получения гомогенного посевного материала в этих опытах использовали метод фракционирования клеток в градиенте плотности сахарозы. Контакт клеток дрожжей с сахарозой во время фракционирования может активировать механизмы катаболитной репрессии и инактивации, и таким образом исказить динамику алкогольоксидазы в синхронно растущей культуре.

Для исключения вышеуказанного эффекта сахарозы мы заменили градиент сахарозы при фракционировании клеток на градиент верографина, в состав которого входят неметаболизируемые дрожжами соединения — натриевая и N-метил-D-плюкзоаминовая соль 3,5-бис(аминоацетил)-2,4,6-триодбензоната. Динамика алкогольоксидазы в синхронно растущей культуре, полученной из гомогенной фракции мелких клеток, выделенных в верографиновом градиенте, изображена на рисунке I. Как видно из представленных результатов, все три максимума почкования сопровождаются резким уменьшением активности алкогольоксидазы в клетках. Это позволяет заключить, что установленное нами уменьшение активности алкогольокси-

дазы при первых максимумах почкования в синхроннорастающих культурах, полученных из посевного материала, выделенного при помощи градиента сахарозы, не является артефактом, обусловленным воздействием сахарозы на клетки дрожжей.

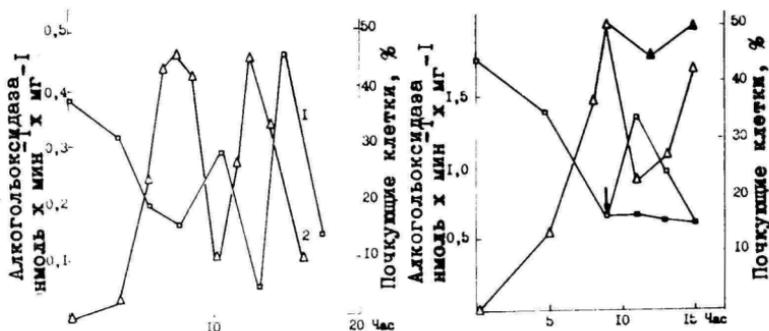


Рис. 1. Динамика активности алкогольоксидазы в синхроннорастающей культуре *S. boidinii*, полученной при помощи фракционирования в градиенте плотности верографина 1 - алкогольоксидаза; 2 - % почкующихся клеток

Рис. 2. Влияние циклогексимида на динамику активности алкогольоксидазы в синхроннорастающей культуре *S. boidinii*

(-□-) алкогольоксидаза до и (-■-) после добавления (→) циклогексимида; (-Δ-) % почкующихся клеток до и (-▲-) после добавления циклогексимида.

Уменьшение активности алкогольоксидазы в синхроннорастающих культурах при переходе клеток к почкованию происходит без значительного увеличения числа клеток в культуре и не может быть объяснено эффектом разбавления фермента в результате синтеза различных белков. Уменьшение активности алкогольоксидазы в этих условиях может быть только результатом инактивации фермента.

Резкое увеличение активности алкогольоксидазы в син-

хроннорастущих культурах в интервалах максимумов почкования показывает, что увеличение содержания алкогольоксидазы в образующихся дочерних клетках происходит параллельно с увеличением их размеров (рис. 1).

Быстрое увеличение активности алкогольоксидазы в образующихся дочерних клетках может быть результатом как синтеза алкогольоксидазы *de novo*, так и реактивации инактивированного фермента.

Ингибитор синтеза белка (трансляции) — циклогексимид, добавленный к синхроннорастущим клеткам во время максимума почкования, полностью подавляет образование активной алкогольоксидазы и приостанавливает отделение сформированных почек от материнских клеток (рис. 2). Это позволяет предположить, что увеличение активности алкогольоксидазы в дочерних клетках, образующихся при почковании, происходит в результате синтеза фермента *de novo*. Однако циклогексимид может подавлять образование белкового фактора реактивации и опыт такого типа не позволяет полностью отрицать роль реактивации в образовании активного фермента.

Ингибитор синтеза РНК (транскрипции) — этидиумбромид, добавленный к синхроннорастущим культурам во время максимума почкования, не препятствует образованию активной алкогольоксидазы (рис. 3А). Но образование алкогольоксидазы подавляется полностью, если ингибитор (этидиумбромид) ввести в культуру за 1,5 часа до максимума почкования (рис. 3Б). Эти результаты позволяют предположить, что транскрипция генетической информации для образования алкогольоксидазы происходит на весьма коротком этапе клеточного цикла. Синтез информационной РНК для последнего процесса совершается, по-видимому, уже до отделения дочерних клеток от материнских и ингибиторы транскрипции после этого уже не подавляют образования алкогольоксидазы. Но образование фермента на этом этапе клеточного цикла остается чувствительным к ингибиторам трансляции (рис. 2).

Образование факторов, участвующих в инактивации алкогольоксидазы, связано также с синтезом белка и подавляется ингибиторами транскрипции и трансляции. Перевод промытых клеток с высокой активностью алкогольоксидазы из начала стационарной фазы роста культур на свежую среду с 0,5% содержанием метанола вызывает быстрое уменьшение активности алкогольоксидазы, которое продолжается в течение 6...9 часов (рис. 4А).

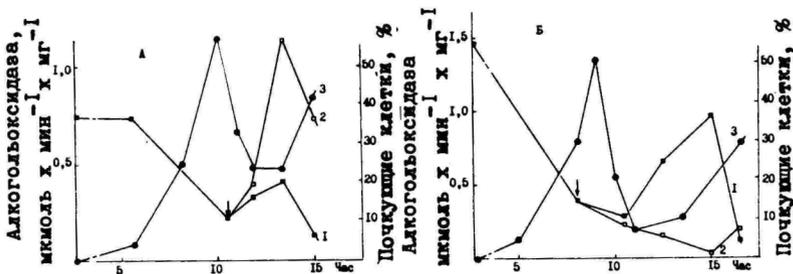


Рис. 3. Влияние этидиумбромида на динамику активности алкогольоксидазы ( $\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ) в синхронно растущей культуре *C. bovidinii* 1 - без этидиумбромида; 2 - с добавлением ( $\rightarrow$ ) этидиумбромида до (Б) и после (А) максимума почкования; 3 - % почкующихся клеток.

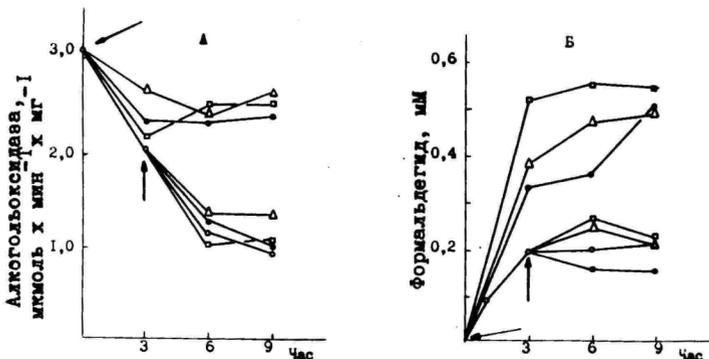


Рис. 4. Влияние ингибиторов транскрипции и трансляции на динамику инактивации алкогольоксидазы у клеток *C. bovidinii* (А) и накопление формальдегида (Б) (—○—) без ингибиторов; (—●—) с циклогексимидом; (—△—) с хлороамфениколом; (—■—) с этидиумбромидом. Время добавления ядов указано стрелкой.

Добавление к суспензиям клеток ингибиторов транскрипции и трансляции (этидиумбромид, циклогексимид, хлороамфеникол) в начале инкубации сильно тормозит инактивацию алкогольоксидазы. В присутствии ингибиторов наблюдается лишь небольшое уменьшение активности фермента в течение первых 2...3 часов, а после этого процесс инактивации приостанавливается (рис. 4А).

Добавление ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот и белка в среду после трехчасовой инкубации клеток в свежей среде, когда активность алкогольоксидазы уменьшилась уже на 30%, не подавляет дальнейшей инактивации фермента. Это показывает, что в клетках из начала стационарной фазы роста культур факторы инактивации алкогольоксидазы отсутствуют или их содержание ничтожное. Реализация генетической информации как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции происходит уже в течение 2...3 часов после перевода клеток из стационарной фазы роста культур на свежую среду, и после этого инактивация алкогольоксидазы становится нечувствительной к ингибиторам синтеза белка.

Неожиданным фактом является подавление инактивации алкогольоксидазы хлороамфениколом, который является специфическим ингибитором синтеза белка в прокариотического типа рибосомах и в дрожжах, по имеющимся данным, подавляет синтез белка только в митохондриях. В наших опытах подавление инактивации алкогольоксидазы хлороамфениколом не имеет однозначного объяснения. Ингибирующий эффект хлороамфеникола на инактивацию алкогольоксидазы может быть вызван различными механизмами: 1. Синтез фактора (факторов) инактивации алкогольоксидазы локализован в митохондриях; 2. Ингибирование синтеза белка в митохондриях косвенно подавляет образование фактора инактивации на рибосомах в цитоплазме, например, в результате нарушения энергетического обмена; 3. Воздействие хлороамфеникола у метанолусваивающих дрожжей не ограничивается подавлением синтеза белка в митохондриях, но ингибируются еще и реакции, которые прямо или косвенно связаны с инактивацией алкогольоксидазы.

Параллельно с инактивацией алкогольоксидазы при инкубировании клеток с высокой активностью алкогольоксидазы в свежей среде с 0,5% содержанием метанола происходит накопление внеклеточного формальдегида (рис. 4Б). В контрольном

варианте в отсутствие ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот и белка максимальный уровень формальдегида (около 0,2 мМ) достигается после трехчасовой инкубации, и в дальнейшем концентрация формальдегида в среде существенно не меняется. Резкое уменьшение активности алкогольоксидазы в этом опытном варианте, по-видимому, препятствует дальнейшему накоплению формальдегида.

В суспензиях клеток, в которых инактивация алкогольоксидазы была подавлена добавлением ингибиторов в начале инкубации, образование формальдегида происходит значительно быстрее и после трехчасовой инкубации его концентрация в среде достигает 0,5 мМ. Везнхуйс с соавторами (Veenhuis et al., 1980) предполагает, что причиной инактивации алкогольоксидазы в хемостатной культуре *Hansenula polymorpha* при переходе от низкой скорости роста к высокой является накопление в среде формальдегида. Как показывают результаты наших опытов (рис. 4Б), высокий уровень формальдегида в среде в присутствии ингибиторов синтеза белка не вызывает инактивации алкогольоксидазы. Следовательно, накопление формальдегида в среде не является непосредственной причиной инактивации алкогольоксидазы.

Вышеприведенный вывод поддерживают и результаты определения динамики активности алкогольоксидазы и формальдегида в растущих культурах *Candida boidinii* при лимитирующих количествах углерода (метанола) или фосфора (рис. 5А и 5Б).

В этих опытах в качестве посевного материала использовали клетки из начала стационарной фазы развития культур с высоким содержанием алкогольоксидазы (3,1 мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup> на 1 мг белка). При росте дрожжей на среде с избыточным содержанием фосфора ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1 г/л) по отношению к углероду (метанол - 0,2% по объему) в лаг-фазе развития культур происходит быстрое уменьшение активности алкогольоксидазы без заметного увеличения в среде концентрации формальдегида. Максимальная активность алкогольоксидазы в этой культуре наблюдается в середине логарифмической фазы роста, а во второй половине логарифмического роста культур активность фермента снова уменьшается, несмотря на ничтожное содержание в среде формальдегида (рис. 5А).

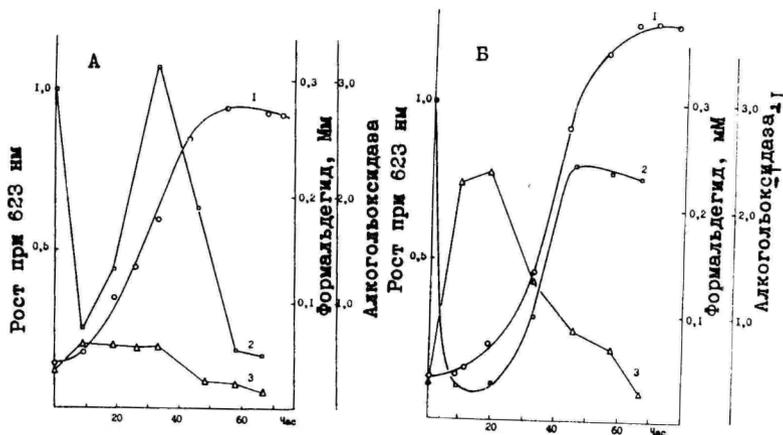


Рис. 5. Динамика роста (I), активности алкогольоксидазы  $\mu\text{кмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$  (2) и формальдегида (3) в культуре *C. boidinii* при ограниченном количестве в среде метанола (А) или фосфора (Б).

При избыточном содержании в среде метанола (0,5% по объему) по отношению к фосфору ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,05 г/л) уменьшение активности алкогольоксидазы в лаг-фазе сопровождается накоплением в среде формальдегида до 0,2 мМ концентрации (рис. 5Б). Сравнительно высокая концентрация формальдегида (от 0,2 до 0,1 мМ) сохраняется в среде в течение всего периода логарифмического роста культуры, но это не препятствует увеличению активности алкогольоксидазы в клетках, которая растет параллельно с развитием культур, и уменьшения активности фермента во второй половине логарифмического роста в этой культуре не происходит (рис. 5Б). Эти результаты показывают, что особенности динамики алкогольоксидазы при ограниченном количестве метанола или фосфора в среде определяется, по-видимому, не динамикой формальдегида, а особенностями развития культур в этих условиях.

Как показывают результаты настоящей работы (рис. 1) и

ранее опубликованные данные (Симискер и др., 1980, 1983), частичная инактивация алкогольоксидазы происходит при переходе клеток к почкованию. Резкое уменьшение активности алкогольоксидазы в лаг-фазе (рис. 5А и 5Б) может быть вызвано одновременной активацией ростовых процессов и подготовкой к почкованию клеток посевного материала, в качестве которого использовали культуру из начала стационарной фазы роста.

Высокая активность алкогольоксидазы в клетках в конце логарифмического роста культуры при лимитирующих количествах фосфора и уменьшение активности этого фермента во второй половине логарифмического роста при недостаточном количестве метанола могут быть также вызваны преобладанием в культурах клеток, находившихся преимущественно в определенной стадии клеточного цикла. В анализируемом опыте клетки из стационарной фазы роста культур при лимитирующем количестве в среде метанола по отношению к фосфору содержали  $62 \times 10^{-15}$  г ДНК, а при ограниченном количестве фосфора —  $45 \times 10^{-15}$  г ДНК. Это позволяет предположить, что при лимитирующем количестве метанола в среде и избыточном количестве фосфора при переходе культур в стационарную фазу процент клеток, находившихся в G-2 фазе, выше, чем у культур, растущих при лимитирующих количествах фосфора по отношению к метанолу. Аналогичные результаты получены у *Schizosaccharomyces pombe* (Bostock, 1970).

Как было показано выше, инактивация алкогольоксидазы в клеточном цикле связана с переходом клеток к почкованию. Возможно, что уменьшение активности алкогольоксидазы во второй половине логарифмического роста культур при избыточном содержании фосфора и лимитирующем количестве метанола (рис. 5А) связано с увеличением в культуре числа клеток, находившихся в S-фазе или G-2 фазе.

Представленные выше данные показывают, что ферментативный аппарат усвоения метанола подвергается в клеточном цикле глубоким преобразованиям. Эти преобразования должны отражаться на физиологической активности клеток. Для проверки этого предположения нами исследовалась динамика скоростей дыхания и усвоения метанола в клеточном цикле при двух концентрациях метанола.

Клетки, находившиеся в различных стадиях клеточного цикла, получали путем фракционирования клеток из середины логарифмической фазы роста.

рифмической фазы роста асинхронно растущей культуры в градиенте сахарозы. Для выяснения влияния сахарозы на физиологическую активность клеток одна порция нефракционированных клеток обрабатывалась 30%-ым раствором сахарозы в таких же условиях, в которых проводилось фракционирование. Определение скоростей дыхания и усвоения метанола до и после пребывания клеток в растворе сахарозы показало, что физиологические функции клеток существенно не уменьшались (табл. I).

Таблица I.

Влияние сахарозы на физиологическую активность клеток *C. boidinii*

Клетки	Концентрация метанола (мм)	Усвоение метанола	Дыхание
			нмоль х мин <sup>-1</sup> х мг <sup>-1</sup>
необработанные	0,3	20	53
сахарозой	3,0	43	145
обработанные	0,3	26	89
сахарозой	3,0	52	129

Результаты определения скорости усвоения метанола и дыхания у различных фракций клеток, полученных центрифугированием в градиенте сахарозы, изображены на рисунках 6А и 6Б. Как видно из представленных результатов, активность алкогольоксидазы во фракциях мелких клеток (I фракция) и почкующихся клеток (IV фракция) примерно в два раза ниже, чем у клеток II и III фракций (рис. 6А). Цитометрическая характеристика клеток из различных фракций приведена в таблице 2. Скорость усвоения метанола как при лимитирующих, так и при насыщающих концентрациях метанола сильно зависит от фракции клеток. У первой и четвертой фракций скорость усвоения метанола при обеих концентрациях метанола в 2...3 раза ниже, чем у II и III фракций клеток с высокой активностью алкогольоксидазы (рис. 6А). Это позволяет предположить, что параллельно с уменьшением активности алкогольоксидазы при переходе клеток к почкованию происходит и резкое уменьшение скорости усвоения метанола. Скорость усвоения метанола ос-

тается низкой и у фракции мелких дочерних клеток. При этом у разных фракций клеток различия в скоростях усвоения метанола при насыщающих концентрациях метанола (3 мМ) выражаются более отчетливо, чем при лимитирующих (0,3 мМ).

Таблица 2.

Распределение клеток (в %) различной величины (в мкм по длинной оси) по фракциям центрифугирования (I, II, III, IV) в градиенте плотности сахарозы

Размеры клеток	Фракция			
	I	II	III	IV
2,5...5,0	86,5	30,8	24,2	6,1
5,0...7,5	13,2	60,3	53,3	40,0
7,5	-	0,7	1,2	23,7
почкующиеся	0,3	8,2	21,3	30,2

Такая же закономерность обнаруживается при исследовании скорости дыхания у различных фракций клеток, но масштабы колебания скорости дыхания в клеточном цикле значительно меньше, чем у скорости усвоения метанола. У клеток I и IV фракций с низкой активностью алкогольоксидазы обнаруживается сравнительно высокая скорость дыхания, особенно при насыщающих (3 мМ) концентрациях метанола.

Низкая скорость усвоения метанола и сравнительно высокая скорость его окисления (дыхания) у клеток I и IV фракций указывает на низкую эффективность использования метанола. Значения  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  у этих клеток 0,25. У клеток II и III фракций высокая скорость дыхания сопровождается высокой скоростью усвоения метанола, и отношение  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  возрастает до 0,53. Это позволяет предположить, что клетки II и III фракций с высокой активностью алкогольоксидазы используют метанол для синтеза клеточного вещества более экономно, чем клетки из I и IV фракций с низкой активностью алкогольоксидазы. При условии, что различия в скоростях усвоения метанола и дыхания у различных фракций клеток отражают колебания этих показателей в клеточном цикле, можно заклю-

ЧИТЬ, ЧТО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТАНОЛА ИЗМЕНЯЕТСЯ В КЛЕТЧНОМ ЦИКЛЕ МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЕЙ В БОЛЬШИХ ПРЕДЕЛАХ.

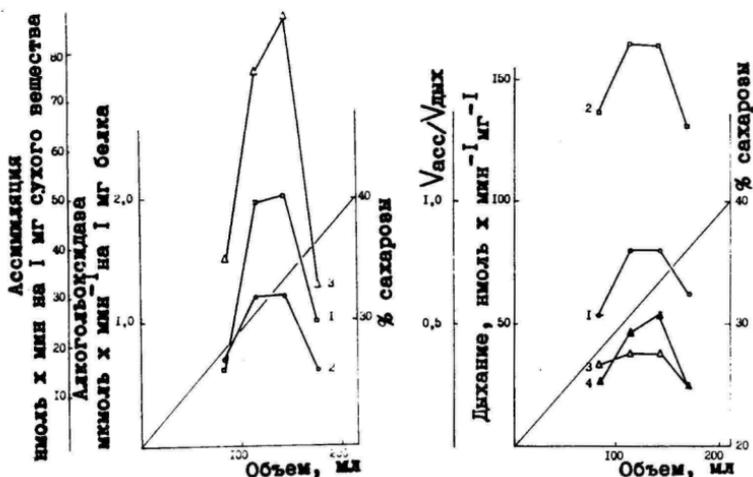


Рис. 6А. Активность алкогольоксидазы и скорость усвоения метанола у различных фракций клеток, полученных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. 1 - алкогольоксидаза; 2, 3 - усвоение метанола при 0,3 и 3 мМ метанола соответственно.

Рис. 6Б. Скорость дыхания и отношение  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  у различных фракций клеток, полученных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. 1, 2 - дыхание при 0,3 и 3 мМ метанола; 3, 4 -  $V_{\text{асс}}/V_{\text{дых}}$  при 0,3 и 3 мМ метанола соответственно.

Представленные на рисунках 6А и 6Б результаты показывают, что у клеток из I и IV фракций с низкой активностью алкогольоксидазы дыхание слабо сопряжено с усвоением метанола, что должно вести к значительным потерям энергии, освобождающейся при окислении метанола. В связи с этим интересно отметить, что эффективность окислительного фосфорилирования

в митохондриях у клеток хемостатной культуры с высокой скоростью роста ниже, чем у клеток с низкой скоростью роста (Шландерер и др. 1977). Как известно, параллельно с увеличением скорости роста метанолусваивающих дрожжей в хемостатной культуре в клетках происходит уменьшение активности алкогольоксидазы.

### Заключение

Представленные в настоящей работе результаты позволяют заключить, что при переходе клеток к почкованию происходит не только частичная инактивация алкогольоксидазы, но и уменьшение скорости усвоения метанола и эффективности его использования. Последний факт позволяет предположить, что изменения в ферментативном аппарате метаболизма метанола при почковании не ограничивается частичной инактивацией алкогольоксидазы, а охватывают, по-видимому, и некоторые другие ферменты, связанные с энергетическим обменом или усвоением формальдегида.

### Л и т е р а т у р а

- Симискер Я.А., Кыйвээр Р., Таллсеп Э.А. Гетерогенность клеток метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* по содержанию алкогольоксидазы. - Микробиология, 1980, т.49, с. 847 - 849.
- Симискер Я.А., Таллсеп Э.А., Кыйвээр Р.К. Колебание активностей пероксисомных ферментов в клеточном цикле метанолусваивающих дрожжей. - Учен.зап. ТГУ, 1983, вып.583. Экспрессия генетической информации и дифференцировка клеток. Труды по цитол. и генетике, 3, с. 96-106.
- Симискер Я., Хейнару Э., Ныгес Т. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii*. - Учен. зап. ТГУ, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиологии, 3, с. 5-20.

- Шландерер Т., Рейманн Дж., Хельд В., Деллверг Х. Выделение интактных митохондрий и исследование окислительного фосфорилирования у дрожжей, выращенных на метаноле. - В сб.: Рост микроорганизмов на  $C_1$ -соединениях. Пушкино, 1977, с. 85 - 87.
- Bostock, C.I. DNA synthesis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. - Exp. Cell Res., 1970, v. 60, p. 16 - 26.
- Giles, K.W., Myers, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. - Nature, 1965, No 4979, p. 93.
- Lowry, O.N., Rosenbrough, A., Farr, K., Randall, K. Protein measurement with Folin phenol reagent. - J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265 - 275.
- Mitchison, J.M., Vincent, W.S. Preparation of synchronous cell cultures by sedimentation. - Nature, 1965, v. 205, p. 987 - 989.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. - Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416 - 421.
- Veenhuis, M., Dijken, J.F., van, Harder, W. In vivo inactivation of alcohol oxidase in the yeast Hansenula polymorpha. - In: 3-rd International symposium on microbial growth on  $C_1$  compounds. Sheffield, 1980, p. 32 - 33.

FLUCTUATIONS IN ALCOHOL OXIDASE ACTIVITY, RESPIRATION  
AND ASSIMILATION RATE IN THE CELL-CYCLE OF YEASTS

R. Kõiveer, N. Peet, J. Simisker

S u m m a r y

Fluctuations in alcohol oxidase activity were studied in synchronous and asynchronous cultures of *Candida boidinii*.

A rapid inactivation of alcohol oxidase was evident in the budding cells of synchronous cultures as well as in the lagphase of batch cultures. Inhibitors of transcription and translation prevent the inactivation of alcohol oxidase. It is suggested that the inactivation of alcohol oxidase should be mediated by a protein factor synthesized before the inactivation of the enzyme.

Not all cases presented a correlation between the formaldehyde accumulation in the medium and the alcohol oxidase inactivation.

Cells differing in alcohol oxidase activity manifest differences in the respiration and methanol assimilation rate as well. The maximum rate of respiration and methanol assimilation can be found in cells with maximum alcohol oxidase activity. The inactivation of alcohol oxidase in the cells of *Candida boidinii* is followed by a decrease in the rate and efficiency of methanol assimilation.

## ПУТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТАНОЛА У ДРОЖЖЕЙ *PICHLA PINUS*

А. Кахру, Т. Аламяз

По литературным данным, энергетическое использование метанола у дрожжей связано с его окислением через формальдегид и формиат (Tani et al., 1972; Roggenkamp et al., 1974). В настоящее время мало данных о роли цитратного цикла и об окислении образующихся при фиксации метанола гексоз в энергетическом обмене метанола у дрожжей (Троценко и др., 1973; Быковская, Троценко, 1980; Sahm, 1977). В настоящей работе мы обсуждаем значение различных путей катаболизма в энергетическом обмене у *Pichia pinus* на основе данных энзимологического и ингибиторного анализов.

### Методика

Объектом исследования в настоящей работе служили метанолусваивающие дрожжи *Pichia pinus*, штамм МН-4 из коллекции ВНИИ генетики.

Дрожжи выращивали, в зависимости от опыта в литровых или трехлитровых колбах при постоянной аэрации с продуванием культур стерильным воздухом. Источниками углерода являлись метанол (0,5%) и глюкоза (0,5%). Клетки выращивали при 30°C. За развитием культур наблюдали по измерению оптической плотности при 623 нм. Методика приготовления бесклеточных экстрактов, определения белка и состав базальной среды приведены в статье Симискера и других (1982).

Активность алкогольоксидазы определяли по Тани (Tani et al., 1972). Инкубационная среда содержала: метанол-33,3 мМ, фосфатный буфер, рН 7,5 - 50 мМ, и бесклеточный экстракт. Образующийся формальдегид определяли ацетилацетоном (Nash, 1953).

Активность каталазы определяли по скорости разложения

$H_2O_2$  измерением оптической плотности при 240 нм. Инкубационная смесь содержала:  $H_2O_2$  - 10 мМ, фосфатный буфер - 100 мМ, рН 7,2 и бесклеточный экстракт (Aebi, 1970).

Активность формальдегидрогеназы определяли по Сахма и Вагнеру (Sahm, Wagner, 1973). Инкубационная смесь содержала: трис - HCl буфер - 50 мМ, рН 7,9; глутатион - 0,5 мМ; формальдегид - 1 мМ; НАД - 0,33 мМ и бесклеточный экстракт.

Активность форматдегидрогеназы определяли по Сахма и Вагнеру (Sahm, Wagner, 1973). Инкубационная смесь содержала: фосфатный буфер - 50 мМ, рН 7,5; формиат натрия - 70 мМ; НАД - 0,33 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакций измеряли по образованию НАДН при 340 нм.

Активность аконитазы определяли по Каллели (Callely et al., 1968). Инкубационная смесь содержала: трис-HCl буфер - 50 мМ, рН 7,6; цитрат натрия - 30 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию аконитата при 240 нм.

Активности НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ определяли исходя из методики Махадо и др. (Machado et al., 1975). Инкубационная смесь содержала: трис-HCl буфер - 50 мМ, рН 7,6;  $MgCl_2$  - 3,3 мМ; глутатион - 3 мМ; НАД или НАДФ - 0,18 мМ и бесклеточный экстракт. Концентрация изоцитрата натрия в инкубационных смесях для определения активностей НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ составляла 6,6 мМ и 3,3 мМ соответственно. Скорость реакции измеряли по образованию НАДН при 340 нм.

Активность  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы определяли по Карлсу и Хансону (Carls, Hanson, 1971). Инкубационная смесь содержала: трис - HCl буфер - 50 мМ, рН 7,6;  $K_2O$  - 0,05 мМ; цистеин - HCl - 50 мМ;  $MgCl_2$  - 2,5 мМ; тиаминпирофосфат - 0,1 мМ;  $\alpha$ -кетоглутарат натрия - 5 мМ; НАД - 0,8 и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию НАДН при 340 нм.

Активность глутаматдегидрогеназы определяли по Ривс и др. (Reeves et al., 1971). Инкубационная смесь содержала: трис-HCl буфер - 50 мМ; НАДФН - 0,25 мМ;  $\alpha$ -кетоглутарат натрия - 5 мМ;  $NH_4Cl$  - 40 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции определяли по убыванию НАДФН при 340 нм.

Активность изоцитратлиазы определяли по Ривс и др. (Reeves et al., 1971). Инкубационная смесь содержала: трис - HCl буфер рН 7,5; фенилгидразин - 4,2 мМ; цистеин - 2 мМ;  $MgCl_2$  -

- 5 мМ; изоцитрат натрия - 2 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию фенилгидразона при 324 нм.

Активность сукцинатдегидрогеназы определяли по Слейтеру и Боннеру (Slater, Bonner, 1952). Инкубационная смесь содержала: фосфатный буфер - 100 мМ, pH 7,6;  $K_3Fe(CN)_6$  - 0,5 мМ; сукцинат натрия - 20 мМ; KCN - 2 мМ; ЭДТА - 1 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по убыванию  $K_3Fe(CN)_6$  при 420 нм.

Активность малатдегидрогеназы определяли по Ривс и др. (Reeves et al., 1971). Инкубационная смесь содержала: трис-HCl буфер - 50 мМ, pH 7,4; оксалоацетат натрия - 0,25 мМ; НАДН - 0,1 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по убыванию НАДН при 340 нм.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по Слай и Доуэлл (Sly, Doelle, 1968). Инкубационная смесь содержала: трис - HCl буфер - 50 мМ, pH 7,5;  $MgCl_2$  - 3,4 мМ; НАДФ - 0,18 мМ; глюкозо-6-фосфат - 3,5 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию НАДФН при 340 нм.

Активность 6-фосфогликолатдегидрогеназы определяли по Слай и Доуэлл (Sly, Doelle, 1968). Инкубационная смесь содержала: трис - HCl буфер - 50 мМ, pH 7,5;  $MgCl_2$  - 0,67 мМ; НАДФ - 0,18 мМ; 6-фосфогликолат - 1,67 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию НАДФН при 340 нм.

Влияние ингибитора цитратного цикла, малоната на скорость включения  $^{14}C$ -ацетата в клеточное вещество определяли в суспензиях клеток. Для приготовления суспензии выделяли клетки из питательной среды центрифугированием при  $+2^{\circ}$ . Клетки промывали средой, не содержащей источника углерода. Промытые клетки суспендировали в той же среде. Плотность суспензии определяли по оптической плотности при 623 нм и по сухому весу. До начала опыта суспензия сохранялась на ледяной бане. Перед добавлением малоната ( $10^{-3}M$ ) в суспензию вводили глюкозу (0,5%) или метанол (0,5%), суспензию аэрировали 20 минут, и через 10 минут в суспензию добавляли  $^{14}C$ -ацетат. Через определенные промежутки времени из суспензии брали пробы. Пробы фиксировали в 80% этаноле. Фиксированный материал разделяли на две фракции - растворимую и нерастворимую. Растворимую фракцию получали обработкой фиксированного

материала последовательно 80% - (2 раза) и 40% (2 раза) этанолом. Неусвоенный радиоактивный ацетат был удален высушиванием растворимой фракции в вакуумных эксикаторах над едким калием. Радиоактивность обеих фракций измеряли торцовым счетчиком.

Для определения продуктов, образующихся из  $I^4C$ -ацетата, растворимую фракцию хроматографировали на бумаге. Разделение проводилось в двух направлениях: первое - этанол-аммиак ( $d = 0,88$ ) - вода (80:4:16); второе - этанол-бутанол-метанол-вода-формиат (36:20:30:20:5). Хроматограммы сушили и совмещали с рентгеновской пленкой в течение 2 - 3 месяцев. Расположение радиоактивных веществ установлено по затемнениям на рентгеновых пленках. Радиоактивные продукты идентифицировали по нанесенным на хроматограммы свидетелям.

### Результаты и обсуждение

У *Pichia pinus* имеется целый набор ферментов пути прямого окисления метанола: алкогольоксидаза, каталаза, формальдегиддегидрогеназа и формиатдегидрогеназа (табл. I). Определенные нами активности каталазы, формальдегиддегидрогеназы и формиатдегидрогеназы в бесклеточных экстрактах *Pichia pinus* аналогичны удельным активностям соответствующих ферментов у *Candida boidinii* и *Hansenula polymorpha* (Roggenkamp et al., 1974; Kato et al., 1974). Однако активность алкогольоксидазы у *Pichia pinus* в 5 раз выше, чем у *Hansenula polymorpha* (van Dijken et al., 1976) и в 20...30 раз выше, чем у *Candida N-16* (Tani et al., 1972). Возможно, что причиной такой разницы является тот факт, что последние авторы, в отличие от нас, инкубационную смесь не аэрировали. Аэрирование может значительно влиять на результаты, поскольку сродство алкогольоксидазы с кислородом невелико (van Dijken et al., 1976). Второй причиной такого расхождения результатов может быть сильная зависимость активности алкогольоксидазы от условий культивирования. В периодических культурах активность алкогольоксидазы в большой степени зависит от стадии культур и состава среды (Dellweg et al., 1975; Veenhuis et al., 1978). Как видно из представленных результатов (табл. I), активность каталазы превышает активность алкогольоксидазы и дегидрогеназ формальдегида и фор-

Таблица I

Влияние условий выращивания на активность (нмоль  
 x мин<sup>-1</sup> на I мг белка) ферментов энергетического обмена  
 у *Pichia pinus*

Фермент	Среда	
	метанол	глюкоза
Алкогольоксидаза	323	5
Каталаза	129 x 10 <sup>4</sup>	128 x 10 <sup>3</sup>
Формальдегиддегидрогеназа	217	87
Формиатдегидрогеназа	114	19
Аконитаза	128	206
Изоцитратдегидрогеназа (НАД)	8	17
Изоцитратдегидрогеназа (НАДФ)	17	51
Изоцитратлиаза	-	9
Глутаматдегидрогеназа (НАДФН)	450	290
α - кетоглутаратдегидрогеназа	61	51
Сукцинатдегидрогеназа	5	14
Фумараза	450	Не опр.
Малатдегидрогеназа	11 x 10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	110	127
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	4	10

П р и м е ч а н и е. Знак "-" - активность отсутствует

миата примерно в  $10^3 \dots 10^4$  раз. Такое соотношение активности ферментов позволяет предположить, что каталаза у *Pichia pinus* при метилотрофном росте функционирует, в основном, пероксидазно, окисляя метанол в пероксисомах в формальдегид.

В клетках, выращенных на среде с глюкозой, образование алкогольоксидазы сильно подавлено (табл. I). Активности дегидрогеназ формальдегида и формиата в клетках, выращенных на глюкозе, в 3...5 раз ниже, чем в клетках, выращенных на метаноле. В наших опытах использовались клетки из второй половины логарифмической фазы роста, и образование ферментов катаболизма метанола могло активироваться в связи с понижением концентрации глюкозы в среде, т.е. в результате дерепрессии синтеза. Предполагается, что образование ферментов катаболизма метанола контролируется в крайней мере частично механизмом дерепрессии, так как их образование обнаружено у *Hansenula polymorpha* и на среде с глюкозой в стационарной фазе роста после расходования субстрата, а также в проточных культурах при лимитирующих скоростях потока (Eggeling, Sahm, 1978; 1980).

Прямой путь окисления метанола через формальдегид и формиат не является у *Pichia pinus*, по-видимому, единственным путем энергетического использования метанола. Бесклеточные экстракты *Pichia pinus* содержат НАДФ-зависимые дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата. Это дает клеткам возможность окислять часть гексозофосфатов, образующихся при ассимиляции формальдегида, до пентозофосфатов. Активности этих ферментов в клетках, растущих на среде с глюкозой, несколько выше, чем в клетках на среде с метанолом. Возможно, что эти реакции важны для регенерации НАДФН.

О функционировании цитратного цикла в дрожжах *Pichia pinus* при метилотрофном росте мы судили по двум критериям: во-первых, по активностям ферментов цитратного цикла в бесклеточных экстрактах;

во-вторых, по включению  $I^4C$ -ацетата в клеточное вещество и по влиянию малоната на скорость включения ацетата.

Активность большинства ферментов цитратного цикла в клетках, выращенных на среде с метанолом, в 2...3 раза меньше, чем в клетках, выращенных на среде с глюкозой (табл. I). К этой группе ферментов относятся аконитаза, изоцитратдегидрогеназа (НАД- и НАДФ-зависимые) и сукцинатдегидрогеназа. Активность  $\alpha$  - кетоглутаратдегидрогеназы, фермента, который

считают лимитирующим звеном цитратного цикла у метилотрофных бактерий (Colby, Zatman, 1972), в наших опытах не зависела от способа выращивания клеток. Активность этого фермента у *Pichia pinus* до 50 раз выше, чем у *Candida methylolica* (Троценко и др., 1973).

Однако не все ферменты цитратного цикла подавляются переходом дрожжей *Pichia pinus* от использования глюкозы на использование метанола. Активность малатдегидрогеназы в 4...8 раз и активность глутаматдегидрогеназы в два раза в клетках, растущих на метаноле, превышают активности этих ферментов в клетках, растущих на глюкозе. Увеличение активности глутаматдегидрогеназы, по-видимому, свидетельствует об увеличении анаболической функции цитратного цикла при метилотрофном питании дрожжей. Анализ продуктов, образующихся из  $^{14}\text{C}$ -ацетата, показал, что радиоактивность находится преимущественно в аминокислотах семейств глутамата и аспартата. Эти результаты подтверждают предположение об увеличении анаболической функции цикла. Но резкое увеличение активности малатдегидрогеназы при переходе клеток к метилотрофному питанию трудно объяснить повышением биосинтетической роли цитратного цикла, так как образование оксалоацетата из продуктов ассимиляции метанола не связано, очевидно, с окислением малата, а с карбоксилированием фосфоэнолпирувата или пирувата. Возможно, что увеличение активности малатдегидрогеназы при переходе клеток на использование метанола связано с увеличением активности цитоплазматической малатдегидрогеназы, образование которой репрессируется в дрожжах глюкозой (Ferguson et al., 1967). В цитоплазме находятся, как известно, и дегидрогеназы формальдегида и формиата. Это дает основание предположить, что цитоплазматическая малатдегидрогеназа участвует в переносе водорода (электронов) из цитоплазмы в митохондрии по следующему принципу. В цитоплазме малатдегидрогеназа восстанавливает оксалоацетат в малат, используя НАДН, который образуется в результате окисления формальдегида и формиата. Малат проникает в митохондрию и окисляется там в оксалоацетат, отдавая водород (электроны) в дыхательную цепь. Для доказательства этой гипотезы надо прежде всего показать у метилотрофных дрожжей наличие двух изоформ малатдегидрогеназы с различной локализацией в клетке.

Наличие в клетках *Pichia pinus* всех ферментов цитратного цикла показывает, что при метилотрофном росте потенциаль-

но может функционировать полный цитратный цикл.

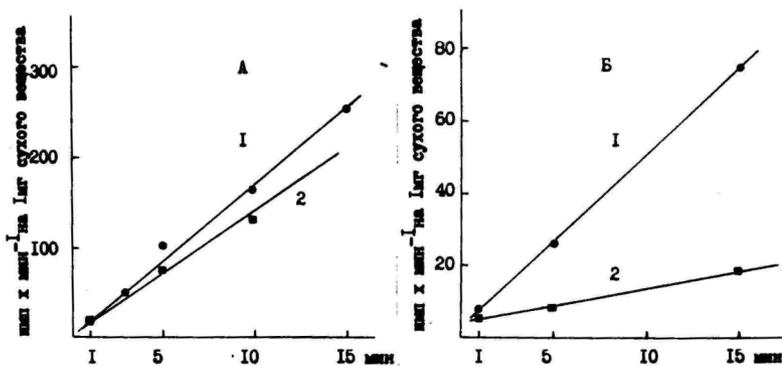


Рис. 1. Включение  $^{14}\text{C}$ -ацетата в клеточное вещество у *Pichia pinus*, выращенной на глюкозе (А) и на метаноле (Б), 1,2 - без и с малонатом соответственно.

Клетки, выращенные на среде с глюкозой, усваивают  $^{14}\text{C}$ -ацетат значительно быстрее, чем клетки, выращенные на среде с метанолом (рис.1). Скорость включения  $^{14}\text{C}$ -ацетата у клеток из среды с глюкозой  $16 \times 10^5$  имп x мин<sup>-1</sup> x мг<sup>-1</sup>, а у клеток из среды с метанолом -  $4 \times 10^5$  имп x мин<sup>-1</sup> x мг<sup>-1</sup>.

При справедливости предположения, что цитратный цикл является в обоих случаях основным механизмом усвоения ацетата, эти результаты свидетельствуют в пользу уменьшения активности цитратного цикла при переходе дрожжей от использования глюкозы на использование метанола. Но учитывая, что скорость роста дрожжей на среде с глюкозой значительно больше, чем на среде с метанолом, причиной более медленного включения ацетата у *Pichia pinus*, выращенных на среде с метанолом, может быть более низкая общая метаболическая активность этих клеток.

У клеток, выращенных на среде с метанолом, малонат сильно подавляет включение ацетата в клеточное вещество (рис.1).

Это указывает на функционирование полного цитратного цикла в этих условиях. Однако, несмотря на сильное ингибирование, малонат не вызывает накопления радиоактивного сукцината. Возможно, что причиной этого являются маленькие величины метаболических фондов промежуточных продуктов цитратного цикла и интенсивное использование их в биосинтезе.

Представленные в настоящей работе результаты показывают, что у *Pichia pinus* при метилотрофном росте имеются полный набор ферментов окисления метанола через формальдегид и формиат, а также цитратный цикл. Энергетическое использование метанола связано в основном с его окислением через формальдегид и формиат. Функционирование цитратного цикла направлено к биосинтезу аминокислот и других продуктов промежуточного обмена, но не исключена и энергетическая функция.

#### Л и т е р а т у р а

- Быковская С.В., Троценко Ю.А. Метаболизм метилотрофных дрожжей *Candida methylica* - Микробиология., 1980, т.49, с. 695 - 701.
- Симискер Я., Хейнару Э., Ныгес Т. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii*. - Учен.зап. ТГУ, 1982, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиол., 3, с. 5-20.
- Троценко Ю.А., Быковская С.В., Кирикова Н.Н. О метаболизме метанола *Candida methylica*. - Доклады АН СССР., 1973, т.211, с. 1230 - 1232.
- Aebi, H. Katalase. - In: Methoden der enzymatischen Analyse, (ed. H.U. Bergmeyer), Berlin: Academic-Verlag, 1970, Bd. 1., S. 636 - 647.
- Callery, A.G. The assimilation of carbon by Chloropseudomonas ethylicum. - Biochem. J., 1968, v. 106, p. 615 - 621.
- Carls, R.A., Hanson, R.S. Isolation and characterization of tricarboxylic acid cycle mutants of Bacillus subtilis. - J. Vacteriol., 1971, v. 106, p. 848 - 855.
- Colby, J., Zatman, L.J. Hexose phosphate synthase and tricarboxylic acid cycle enzymes in Bacterium 4B6, an ob-

- ligate methylotroph. - Biochem. J., 1972, v. 128, p. 1373 - 1376.
- Dellweg, H., Schlanderer, G., Diel, F., Held, W. Analytical investigation of a batch culture of Kloeckera sp. 2201 grown on methanol. - In: Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds. The Soc. Ferment., Technol., 1975, p. 149-153.
- Dijken, J.P., van, Otto, R., Harder, W., Growth of Hansenula polymorpha in a methanol-limited chemostat. - Arch. Microbiol., 1976, v. 111, p. 134 - 144.
- Eggeling, L., Sahn, H. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in Hansenula polymorpha. - Europ. J. Appl. Microbiol., 1978, v. 5, p. 197 - 202.
- Eggeling, L., Sahn, H. Regulation of alcohol oxidase synthesis in Hansenula polymorpha: Oversynthesis during growth on mixed substrates and induction by methanol. - Arch. Microbiol., 1980, v. 127, p. 119 - 124.
- Ferguson, J.J., Boll, M., Holzer, H. Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation in catabolite repression. - Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, p. 21 - 25.
- Kato, N., Tani, Y., Ogata, K. Enzyme system for methanol oxidation in yeasts. - Agr. Biol. Chem., 1974 v. 38, p. 675 - 677.
- Machado, A., Mayor, F., de Castro, J.N. Isocitrate dehydrogenases activities of baker's yeast grown in a variety of hypoxic conditions. - Molec. and Cell Biochem., 1975, v. 6, p. 93 - 101.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. - Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416 - 421.
- Reeves, H.C., Rabin, R., Wegener, W.C., Ajl, S.J. Assays of enzymes of the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles. - In: Methods in microbiology. - London: Academic Press, 1971.
- Roggenkamp, R., Sahn, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. Induction and function of catalase in Candida boidinii. - FEBS Letters, 1974, v. 41, p. 283-286.
- Sahn, H. Metabolism of methanol by yeasts. - In: Advances in Biochemical Engineering 6. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1977, p. 77 - 103.

- Sahn, H., Wagner, F. Mikrobielle Verwertung von methanol Eigenschaften der Formaldehyddehydrogenase und der Formatehydrogenase aus Candida boidinii. - Arch. Microbiol., 1973, v. 90, p. 263 - 268.
- Slater, E.C., Bonner, W.D. The effect of fluoride on the succinic oxidase system. - Biochem. J. 1952, v. 52, p. 185 - 196.
- Sly, L.J., Doelle, H.W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in cell-free extracts of Zygomonas mobilis. - Arch. für Mikrobiol., 1968, v. 63, p. 197 - 199.
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeasts, Kloeckera sp. No 2201. - Agr. Biol. Chem., 1972, v. 36, p. 68 - 75.
- Veenhuis, M., Dijken, J.P., van, Pilon, S.A.F., Harder, W. Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast Hansenula polymorpha - and its relation to environmental conditions. - Arch. Microbiol., 1978, v. 117, p. 153 - 163.

## PATHWAYS OF ENERGETIC UTILIZATION OF METHANOL IN YEASTS

A. Kahru, T. Alamäe

### S u m m a r y

Activities of enzymes of methanol metabolism were determined in cell-free extracts of glucose-grown and methanol-grown cells of Pichia pinus. Extracts of glucose-grown cells exhibit minimal activity of alcohol oxidase. Activities of formaldehyde and formate dehydrogenases in glucose-grown cells are 3 to 5 times lower than in methanol-grown cells.

Most of the enzymes of the citric acid cycle are in methanol-grown cells 2 to 3 times less active than in glucose-grown cells. However, methanol had no repressive effect on  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase synthesis. Activities of malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in methanol-grown cells were even higher than in glucose-grown cells.

Enzymes of the citric acid cycle found in cell-free extracts of methanol-grown Pichia pinus and a strong inhibition of radioactivity incorporation from acetate into the cell material by malonate give evidence of a functioning citric acid cycle in cells during their methylotrophic growth.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА  
ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА

*У Pichia pinus*

Т. Аламяз, Х. Тэугяс

Окисление метанола до  $CO_2$  у метанолусваивающих дрожжей происходит при помощи алкогольоксидазы, каталазы, формальдегиддегидрогеназы и формиадегидрогеназы (Sahm, 1977). Образование этих ферментов сопровождается ростом дрожжей на среде с метанолом. Как было показано у *Kloeckera No 22QI* (Tani et al., 1972), у *Candida Boidinii* (Sahm, Wagner, 1973), у *Candida N-16* (Fujii, Tomomura, 1972), активности алкогольоксидазы и дегидрогеназ формальдегида и формиаата отсутствуют при росте дрожжей на глюкозе или этаноле, а активность каталазы в этих условиях невысокая. По данным Сахма (Sahm, 1977), синтез ферментов катаболизма метанола индуцируется также продуктами его катаболизма — формальдегидом и формиаатом.

Однако, выращивая дрожжи *Hansenula polymorpha* на глюкозе до глубокой стационарной фазы, Эггелинг и Сахм наблюдали образование всех ферментов катаболизма метанола (Eggeling, Sahm, 1978). Репрессирующий эффект глюкозы зависит от его концентрации в среде, и при низких скоростях разбавления в кемостатных культурах *Hansenula polymorpha* синтез указанных ферментов активируется (Egli et al., 1980). Сорбитол, глицерол, рибоза и ксилоза являются более слабыми репрессорами синтеза ферментов катаболизма метанола, чем глюкоза или этанол, и при росте дрожжей на средах с вышеуказанными субстратами в периодических культурах *Hansenula polymorpha* сохраняется до 70% активности ферментов по сравнению с ростом на среде с метанолом. Эти результаты позволяли заключить, что регуляция синтеза ферментов метаболизма метанола осуществляется механизмами дерепрессии (Eggeling, Sahm, 1978; Egli et al., 1980).

Однако дерепрессия, по-видимому, не является единственным механизмом, который определяет уровень этих ферментов в клетках метанолюсваивающих дрожжей. При росте дрожжей на среде, содержащей одновременно метанол и один из многоуглеродных соединений (глюкоза, сорбоза, глицерол), активность ферментов катаболизма метанола выше, чем при росте на средах, содержащих только один из указанных многоуглеродных соединений (Eggeling, Sahm, 1980). Эти данные позволяли предположить, что в регуляции синтеза ферментов катаболизма метанола участвуют и механизмы индукций.

В настоящей работе приведены результаты изучения синтеза ферментов метаболизма метанола у дрожжей *Pichia pinus* при росте на средах с глицеролом, ксилозой, глюкозой и сукцинатом и на их смесях с метанолом.

#### М е т о д и к а

Объектом исследования в настоящей работе были метанолюсваивающие дрожжи *Pichia pinus*, штамм МН - 4 из коллекции ВНИИ генетики.

Дрожжи выращивали в трех- или пятилитровых колбах при постоянной аэрации. Среда для выращивания дрожжей содержала следующие источники углерода: метанол - 3 мл/л; глицерол - 1,83 мл/л; ксилоза - 2,25 г/л; сукцинат - 2,22 г/л; глюкоза - 2,25 г/л. В опытах с двумя субстратами (метанол и один из многоуглеродных соединений) использованы следующие концентрации многоуглеродных субстратов: глицерол - 0,92 мл/л; ксилоза - 1,12 г/л; сукцинат - 1,11 г/л; глюкоза - 1,12 г/л. Концентрация метанола в опытах со смешанными субстратами составляла 1,5 мл/л. Состав базальной среды приведен в работе Симискера и других (1982).

Через определенные промежутки времени, следя за ростом культуры, брались пробы для определения концентрации субстрата или субстратов. Для этого клетки удаляли из проб фильтрованием культуральной жидкости через мембранный фильтр. За развитием культур следили по измерению оптической плотности при 623 нм на спектрофотометре. Для определения активностей ферментов брали пробы по 200...500 мл. Клетки собирали центрифугированием при 2° в течение 15 мин при 6000g и дважды промывали в фосфатном буфере (50 мМ, pH 7,2). Методика при-

готовления бесклеточных экстрактов приведена в работе Симискера и других (1982). Содержание белка в экстрактах определяли по Лоури (Lowry, 1951).

Активность алкогольоксидазы определяли по Тани (Tani et al., 1972). Инкубационная смесь содержала метанол - 33,3 мМ; фосфатный буфер, pH 7,2 - 50 мМ и бесклеточный экстракт. Образующийся формальдегид определяли ацетилацетоном (Nash, 1953).

Активность каталазы определяли по скорости разложения  $H_2O_2$  измерением оптической плотности при 240 нм. Инкубационная смесь содержала  $H_2O_2$  - 10 мМ; фосфатный буфер, pH 7,2 - 50 мМ и бесклеточный экстракт (Lebl, 1970).

Активность формальдегиддегидрогеназы определяли по скорости восстановления НАД при 340 нм. Инкубационная смесь содержала формальдегид - 3 мМ; фосфатный буфер - 50 мМ, pH 7,2; глутатион - 0,66 мМ; НАД - 0,33 мМ (Rose, Racker, 1962).

Активность формиатдегидрогеназы определяли по Като и др. (Kato et al., 1974). Инкубационная смесь содержала фосфатный буфер, pH 7,2 - 50 мМ; формиат натрия - 33,3 мМ; НАД - 0,33 мМ и бесклеточный экстракт.

Активность киназы дигидроксиацетона определяли по Гофманн и Бабел (Hofmann, Babel, 1980). Инкубационная смесь содержала: имидазольный буфер (HCl), pH 7,0 - 50 мМ; дигидроксиацетон - 0,5 мМ;  $MgSO_4$  - 5 мМ; АТФ - 2,5 мМ; НАДН - 0,12 мМ;  $\alpha$  - глицерофосфатдегидрогеназу из мышцы кролика - 0,8 ... 3,2 ед. До начала реакции смесь инкубировали в течение трех минут, а затем добавляли бесклеточный экстракт. Чтобы следить за эндогенным окислением НАДН, из инкубационной смеси были исключены АТФ и дигидроксиацетон.

Концентрацию глюкозы определяли 3,5 - динитросалициловой кислотой (Коренман, 1970). Реактивом служил водный раствор, 1 л которого содержал 10 г 3,5 - динитросалициловой кислоты, 300 г сегнетовой соли и 16 г NaOH. Смешивали 0,5 мл изучаемого раствора с 1 мл реактива, нагревали 5 мин при 100° и охлаждали. Раствор разбавляли водой до объема 12,5 мл и определяли плотность окраски при 530 нм. По калибровочной кривой рассчитывали содержание глюкозы в пробе.

Концентрацию ксилиты в культуральной жидкости определяли по Мейбаум (Филиппович и др., 1975). Для изготовления орцинового реактива 2 г орцина растворяли в 1 л 30%-ой соляной кислоты и добавляли 1 г  $FeCl_3$ . В двадцатимиллилитровую

пробирку вносили 1 мл испытуемого раствора (разбавленного при необходимости до 200 раз) и прибавляли 1 мг ординового реактива. Пробирку закрывали стеклянной пробкой и на 40 мин ставили на кипящую водяную баню. Затем пробу охлаждали и определяли плотность зеленой окраски при 675 нм. Содержание ксилозы в культуральной жидкости рассчитывали по калибровочной кривой.

Концентрацию метанола в культуральной жидкости определяли алкогольоксидазой (Тэугис, Кангур, 1982).

### Результаты и обсуждение

Результаты влияния различных источников углерода на образование ферментов метаболизма метанола приведены на рисунках 1...9. Как видно из представленных результатов, наиболее сильными репрессорами образования ферментов метаболизма метанола у *Pichia pinus* являются глюкоза и ксилоза (рис. 1 и 2).

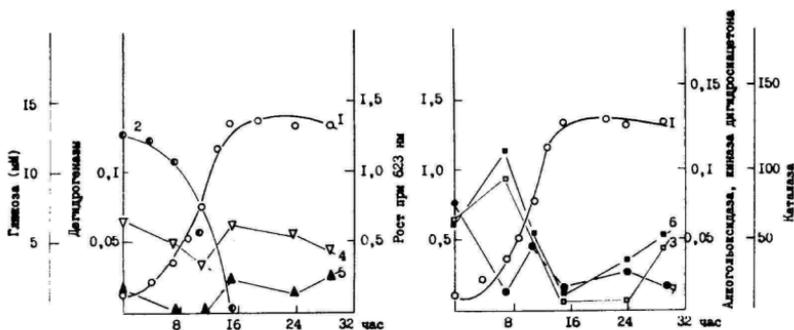


Рис. 1. Рост *Pichia pinus* на глюкозе и удельные активности ферментов метаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - концентрация глюкозы в среде; 3 - алкогольоксидаза; 4 - формальдегиддегидрогеназа; 5 - формиатдегидрогеназа; 6 - каталаза; 7 - киназа дигидроксиацетона.



Рис. 2.

Рис. 2. Рост *Pichia pinus* на ксилозе и удельные активности ферментов катаболизма метанола ( $\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - концентрация ксилозы в среде; 3 - алкогольоксидаза; 4 - формальдегиддегидрогеназа; 5 - формиатдегидрогеназа; 6 - каталаза.

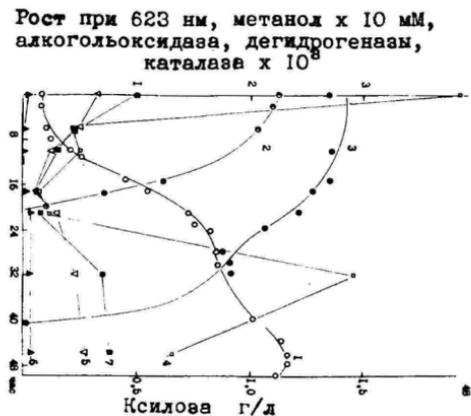


Рис. 3.

Рис. 3. Рост *Pichia pinus* на смешанной среде метанола и ксилозы и удельные активности ферментов катаболизма метанола ( $\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - концентрация ксилозы в среде; 3 - концентрация метанола в среде; 4 - алкогольоксидаза; 5 - формальдегиддегидрогеназа; 6 - формиатдегидрогеназа; 7 - каталаза.

При росте дрожжей на этих субстратах подавлен синтез всех ферментов катаболизма метанола, а также киназы дигидроксиацетона. Наиболее слабо репрессия глюкозой и ксилозой выражена в отношении формальдегиддегидрогеназы. Образование этого фермента оказалось малочувствительным к глюкозной репрессии также в проточных культурах *Candida boidinii* (Schlanderer et al., 1978). Существенного увеличения активности исследуемых ферментов в стационарной фазе роста на средах с глюкозой и ксилозой в наших опытах не наблюдалось (рис. 1 и 2). В этом отношении *Pichia pinus* отличается от *Hansenula polymorpha*, у которой синтез ферментов катаболизма метанола активируется в отсутствие репрессоров (Eggeling, Sahm, 1978).

При росте *Pichia pinus* на среде, содержащей одновременно глюкозу или ксилозу и метанол, обнаруживается бифазный рост с промежуточным плато на кривых роста - диауксия (рис. 3 и 4). Во время первой логарифмической фазы роста происходит использование сахаров (глюкозы и ксилозы), а во время второй - метанола. При использовании глюкозы и ксилозы образование ферментов метаболизма метанола репрессировано и активируется после расходования сахаров.

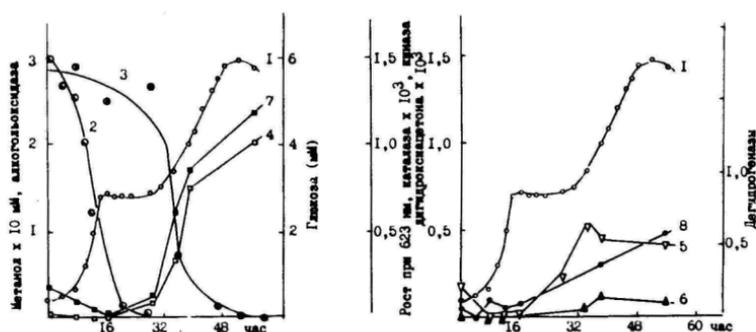


Рис. 4. Рост *Pichia pinus* на смешанной среде метанола и глюкозы и удельные активности ферментов метаболизма метанола ( $\mu\text{кмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - концентрация глюкозы в среде; 3 - концентрация метанола в среде; 4 - алкогольоксидаза; 5 - формальдегиддегидрогеназа; 6 - формиатдегидрогеназа; 7 - каталаза; 8 - киназа дигидроксиацетона.

Рост при 623 нм, дегидрогеназы, каталаза  $\times 10^3$ , киназа дигидроксиацетона  $\times 10^{-1}$



Рис. 5

Рост при 623 нм, формальдегиддегидрогеназа, форматдегидрогеназа  $\times 10^3$ , каталаза  $\times 10^3$



Рис. 6

Рис. 5. Рост *Pichia pinus* на смешанной среде метанола и сукцината и удельные активности ферментов метаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - концентрация метанола в среде; 3 - алкогольоксидаза; 4 - формальдегиддегидрогеназа; 5 - форматдегидрогеназа; 6 - каталаза; 7 - киназа дигидроксиацетона.

Рис. 6. Рост *Pichia pinus* на смешанной среде метанола и глицерола и удельные активности ферментов катаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). 1 - рост; 2 - алкогольоксидаза; 3 - формальдегиддегидрогеназа; 4 - форматдегидрогеназа; 5 - каталаза.

Интересным является сильноингибирующий эффект ксилозы на образование ферментов катаболизма метанола у *Pichia pinus*. У *Hansenula polymorpha* пентозы (рибоза и ксилоза) подавляют синтез этих ферментов только на 30% (Eggeling, Sahm, 1978). Такое поведение может быть вызвано видовыми различиями.

Глицерол и сукцинат являются более слабыми репрессорами синтеза ферментов метаболизма метанола, чем глюкоза и ксилоза. На средах, содержащих одновременно сукцинат или глицерол и метанол, синтез ферментов метаболизма метанола частично активируется (рис. 5 и 6), но уровни ферментов остаются несколько ниже, чем в клетках, выращенных на среде с метанолом (рис. 7).

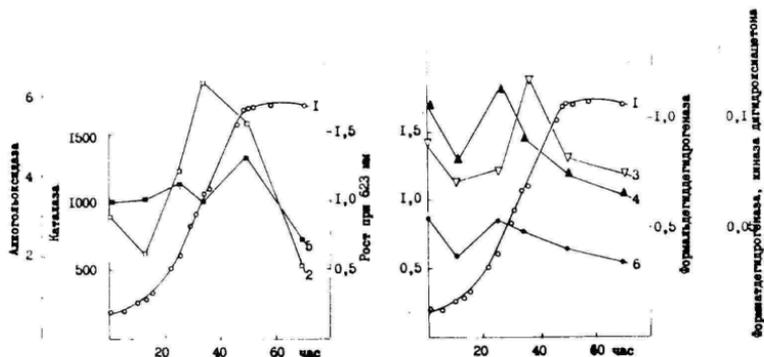


Рис. 7. Рост *Pichia pinus* на метаноле и удельные активности ферментов метаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). I - рост; 2 - алкогольоксидаза; 3 - формальдегиддегидрогеназа; 4 - форматдегидрогеназа; 5 - киназа дигидроксиацетона.

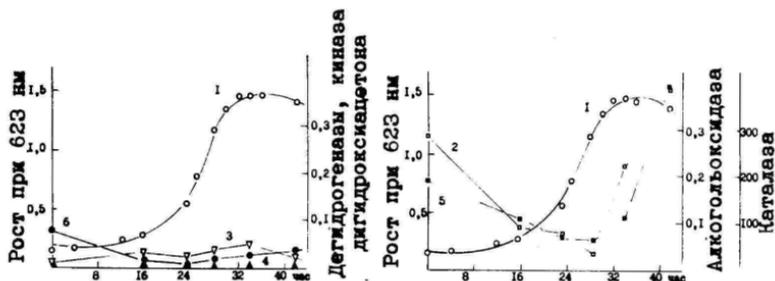


Рис. 8. Рост *Pichia pinus* на сукцинате и удельные активности ферментов метаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). I - рост; 2 - алкогольоксидаза; 3 - формальдегиддегидрогеназа; 4 - формиатдегидрогеназа; 5 - каталаза; 6 - киназа дигидроксиацетона.

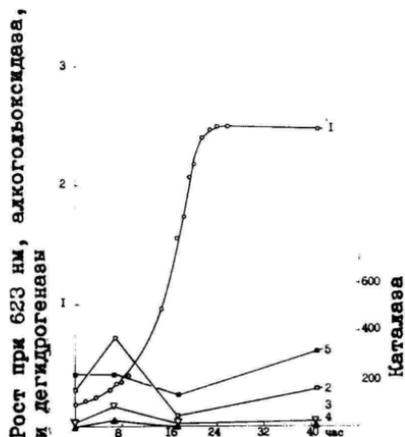


Рис.9. Рост *Pichia pinus* на глицероле и удельные активности ферментов катаболизма метанола ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ). I - рост; 2 - алкогольоксидаза; 3 - формальдегиддегидрогеназа; 4 - формиатдегидрогеназа; 5 - каталаза.

Во время логарифмического роста на средах с сукцинатом или глицеролом активности ферментов метаболизма метанола низкие (рис. 8 и 9). Следовательно, для образования ферментов метаболизма метанола при росте дрожжей *Pichia pinus* на указанных субстратах также требуется наличие метанола как индуктора.

#### Л и т е р а т у р а

- Тэугяс Х., Кангур Р. Определение метанола при помощи алкогольоксидазы. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиол., 3 с. 60-66.
- Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. - М.: Химия, 1970. - 342 с.
- Симискер Я., Хейнару Э., Ныгес Т. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii*. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиол., 3, с. 5-20.
- Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. - М.: Просвещение, 1975. - 317 с.
- Aebi, H. Katalase. - In: Methoden der enzymatischen Analyse, (ed. H.U. Bergmeyer) - Berlin: Academic-Verlag, 1970, Bd. 1, S. 636 - 647.
- Eggeling, L., Sahm, H. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in Hansenula polymorpha - European J. Appl. Microbiol., 1978, v. 5, p. 197 - 202.
- Eggeling, L., Sahm, H. Regulation of alcohol oxidase synthesis in Hansenula polymorpha: oversynthesis during growth on mixed substrates and induction by methanol. - Arch. Microbiol., 1980, v. 127, p. 119 - 124.
- Egli, Th., Dijken, J.P., van, Veenhuis M., Harder, W., Fiechter, A. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. - Arch. microbiol., 1980, v. 124, p. 115 - 121.
- Hofmann, K.H., Babel, W. Dihydroxyacetone kinase of methanol-assimilating yeasts. - Z. Allg. Mikrobiol., 1980, Bd. 20, S. 339 - 404.

- Kato, N., Kano, M., Tani, Y., Ogata, K. Purification and characterization of formate dehydrogenase in a methanol-utilizing yeast, Kloeckera sp. No. 2201. - Agr. Biol. Chem., 1974, v. 38, p. 111 - 116.
- Lowry, O.N., Rosenbrough, A., Farr, K., Randall, K. Protein measurement with Folin phenol reagent. - J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265 - 275.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. - Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416 - 421.
- Rose, Z.B., Racker, E. Formaldehyde dehydrogenase from baker's yeast. - J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p. 3279 - 3281.
- Sahm, H. Metabolism of methanol by yeasts. - In: Advances in Biochemical Engineering 6. - Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1977, p. 77 - 103.
- Sahm, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. The ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. - Eur. J. Biochem., 1973, v. 36, p. 250 - 256.
- Schländler, G., Held, W., Reimann, J., Dellweg, H. Metabolic changes during substrate shifts in continuous cultures of the yeast Candida boidinii variant 60. - European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1978, v. 6, p. 133 - 144.
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast, Kloeckera sp. No. 2201 - Agr. Biol. Chem., 1972, v. 36, p. 68 - 75.

EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE FORMATION OF ENZYMES OF  
METHANOL METABOLISM IN PICHIA PINUS

T. Alamäe, H. Teugjas

S u m m a r y

The regulation of the synthesis of enzymes of methanol metabolism was investigated in a methanol-utilizing yeast Pichia pinus during its growth on different carbon and energy sources and on their mixtures with methanol.

Glucose and xylose had the highest repressive effect on the formation of enzymes of methanol metabolism. The repressive effect of glycerol or succinate on the synthesis of the corresponding enzymes is much lower than that of xylose or glucose. Still the levels of enzymes of methanol metabolism are not comparable to activities detected in the extracts of methanol-grown cells.

Since the activities of methanol metabolizing enzymes are low during the growth of Pichia pinus on glucose, xylose, succinate or glycerol, and there is no marked de-repression of the synthesis in the late stationary phase of growth, induction by methanol seems to play a leading role in the regulation of the synthesis of methanol metabolizing enzymes.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАНОЛА ПРИ ПОМОЩИ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ

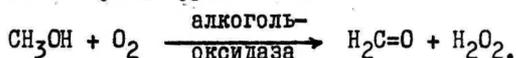
Х. Тэугяс, Р. Кангур

Для количественного определения метанола предложен ряд фотометрических методов, которые основываются на окислении метанола в формальдегид и определении последнего по реакции с хромотроповой или фуксинсернистой кислотой. Окисление метанола осуществляется, как правило, перманганатом (Коренман, 1970).

В настоящей работе мы предлагаем методику определения метанола, в которой окисление метанола в формальдегид осуществляется при помощи дрожжевой алкогольоксидазы.

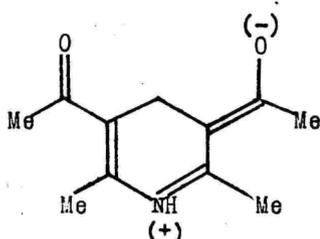
### Принцип определения

Окисление метанола в формальдегид алкогольоксидазой характеризуется следующим уравнением:



Как видно из приведенного уравнения, поглощение кислорода и образование формальдегида происходит эквимолярно расходованию метанола, и количество последнего в реакционной смеси может быть измерено либо по количеству поглощенного кислорода, либо по количеству образованного формальдегида.

Надо иметь в виду, что алкогольоксидаза окисляет помимо метанола и другие первичные спирты с небольшим числом углеродных атомов (Tani et al., 1972), и наличие в исследуемом образце различных первичных спиртов ведет к образованию смеси альдегидов. Количественное определение формальдегида в присутствии других альдегидов можно провести ацетилацетоном, который, реагируя с формальдегидом, образует 3,5-диацетил-1,4-дигидропиримидин.



Продукт реакции имеет максимум поглощения при 412 нм, молекулярный коэффициент экстинкции  $7,7 \times 10^3$  и просто определяется спектрофотометрически (Nash, 1953).

При условии, что исследуемый раствор, кроме метанола, не содержит других первичных спиртов, количество метанола можно определить и на основе расходуемого кислорода или образованного перекиси водорода.

#### Выделение алкогольоксидазы из дрожжей

В качестве источника алкогольоксидазы в настоящей работе использованы метанолусваивающие дрожжи *Candida boidinii*. Состав питательной среды и условия культивирования приведены в работе Симискера и других (1982). У метанолусваивающих дрожжей образование алкогольоксидазы индуцируется метанолом и репрессируется различными многоуглеродными соединениями (Sahm, Wagner, 1973; Eggeling, Sahm, 1980).

Содержание алкогольоксидазы в клетках при росте дрожжей на среде с метанолом варьируется в больших пределах в зависимости от условий культивирования. В периодических культурах максимальное содержание алкогольоксидазы в клетках наблюдается в конце логарифмической и в начале стационарной фазы развития культур. В проточных культурах содержание алкогольоксидазы в клетках увеличивается параллельно с уменьшением скорости разбавления (van Dijken et al., 1976).

Исходя из вышесказанного в качестве исходного материала при выделении алкогольоксидазы в настоящей работе использовались клетки из начала стационарной фазы развития культур.

Методика очистки алкогольоксидазы основывалась на схеме, предложенной Тани (Tani et al., 1972). Клетки дрожжей выделяли из среды центрифугированием при  $+2^0$  и дважды про-

мывали в фосфатном буфере, pH 7,5; 50 мМ. Около 20 граммов клеток (сырой вес) разрушали прессом типа Хьюза при  $-40^{\circ}$ . Неразрушенные клетки и клеточные осколки удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 16000g при  $+2^{\circ}$ . Мелкие клеточные структуры из полученного бесклеточного экстракта удаляли центрифугированием при 120 000g в течение 3 часов. Алкогольоксидазу выделяли из супернатанта хроматографированием на колонке с ДЭАЭ целлюлозой, уравновешенной 50 мМ фосфатным буфером, pH 7,5. Размеры колонки: d = 3 см и h = 33 см. Для вытеснения алкогольоксидазы из колонки применяли линейный градиент NaCl от 0 до 0,2 мМ в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Алкогольоксидаза выходила из колонки в интервале концентрации NaCl от 150 до 180 мМ (рис. 1).

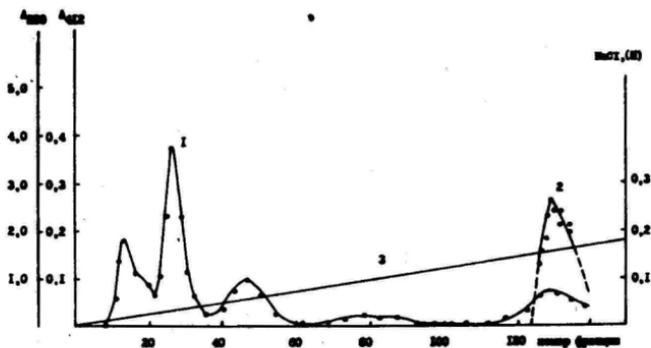


Рис. 1. Хроматографирование алкогольоксидазы на ДЭАЭ-целлюлозе. 1 — кривая абсорбции белка при 280 нм; 2 — активность алкогольоксидазы; 3 — градиент концентраций NaCl.

Фракции, содержащие алкогольоксидазу, были объединены и концентрированы ультрафильтрацией до 3...5 мг белка в мл. NaCl удалялся из препарата диализом против 50 мМ фосфатного буфера. Активность алкогольоксидазы определяли по Тани (Tani et al., 1972). Выделенный по вышеуказанному методу препарат алкогольоксидазы имел удельную активность  $4,8 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ .

Проверка чистоты фермента осуществлялась диск-электрофоретически на полиакриламидном геле по Мауреру (1971). По-

лосы белка на электрофореограммах выделяли окрашиванием в 1% растворе амидочерного ЮБ. Для энзимологического проявления алкогольоксидазы использовалась инкубационная среда следующего состава: 12 мг диаминобензицина тетрагидрохлорида; 1,2 мг пероксидазы из хрена; 28,2 мл 50 мМ фосфатного буфера, pH 7,0. После инкубирования гелей в этой среде, в темноте, в течение 45 минут добавляли метанол (33,3 мМ) и гелей инкубировали еще в течение 60 мин. Алкогольоксидаза проявлялась в виде темнокоричневых полос.

На электрофореограммах (7,5% акриламида) препарат алкогольоксидазы дал две полосы белка с близкими значениями Rf (0,0430 и 0,0715). Обе полосы имели алкогольоксидазную активность. Полосы белка, не имеющие активности алкогольоксидазы, на электрофореограммах не обнаружены.

#### Определение метанола по образующему формальдегиду

Окисление метанола в формальдегид проводилось в реакционной смеси следующего состава: фосфатный буфер, pH 7,5; 50 мМ; алкогольоксидаза удельной активности 4,8 мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup> 0,075 мг/мл и метанол. Реакция проводилась при 30° при постоянном перемешивании инкубационной смеси магнитной мешалкой. Кинетика образования формальдегида при различных концентрациях метанола изображена на рисунке 2. Как видно из результатов, при использовании алкогольоксидазы вышеуказанной концентрации окисление метанола совершается в течение 4...5 минут и достигаемый уровень формальдегида в реакционной смеси сохраняется в течение 10 минут. Продление времени инкубации до 15 минут ведет к незначительному уменьшению концентрации формальдегида.

При серийном анализе к 1,95 мл исследуемого раствора в 100 мМ фосфатном буфере, pH 7,5 добавляли 0,05 мл препарата алкогольоксидазы, и смесь инкубировали в течение 7 минут при 30°. Затем фермент инактивировали нагреванием смеси на кипящей водяной бане в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и к раствору добавляли 2 мл реактива Нэша (Nash, 1953) и затем в течение 10 мин нагревали при 60°. Концентрацию образуемого окрашенного продукта определяли на спектрофотометре измерением поглощения при 412 нм. Контрольная кювета содержала смесь фосфатного буфера и реактива Нэша (1:1), обработанного аналогично опыту. В

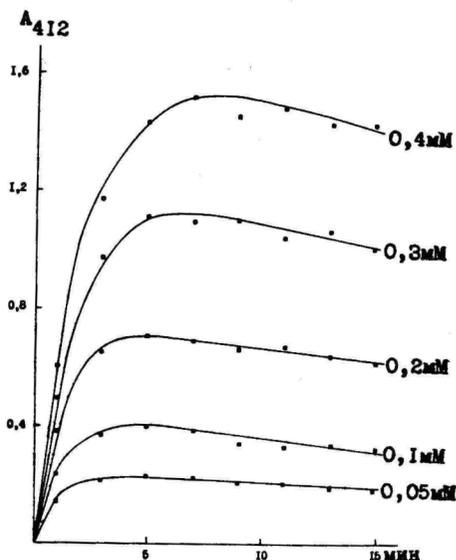


Рис. 2. Кинетика образования формальдегида алкогольоксидазой при различных концентрациях метанола.

состав реактива Нэша входят: ацетат аммония—150 г/л, ледяная уксусная кислота — 3 мл/л, ацетилацетон — 2 мл/л.

Удовлетворительные результаты определения метанола по вышеприведенной методике достигаются при его концентрации в инкубационной среде от 0,05 до 0,3 мМ (1,6...9,6 мг/л). Максимальный выход формальдегида составляет до 92% от теоретического, вычисленного на основе молярного коэффициента экстинкции ( $7,7 \times 10^3$ ).

#### Определение метанола по поглощению кислорода

Окисление метанола в формальдегид алкогольоксидазой сопровождается эквимоллярным поглощением кислорода. Для установления уменьшения кислорода в реакционной смеси нами был приспособлен полярографический метод измерения кислорода. Полярографическая ячейка с конструкцией, предложенной Шольцом

и Островским (1975), с рабочим объемом 1,5 мл позволяет определить метанол от 10 до 300 нмолей. Расходование кислорода прямо пропорционально зависит от количества метанола, введенного в ячейку (рис. 3), метанол обнаруживается практически стопроцентно.

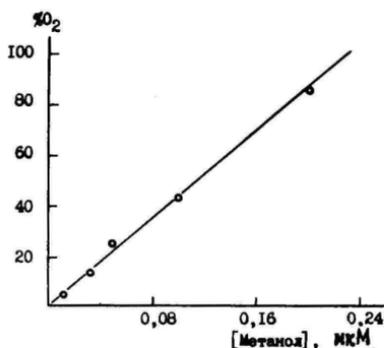


Рис. 3. Расход кислорода при различных концентрациях метанола при окислении его алкогольоксидазой.

При анализе в ячейку ввели 1,45 мл исследуемого раствора и регистрировали максимальный ток. Затем в ячейку добавляли 0,05 мл препарата алкогольоксидазы и смесь инкубировали до окончания реакции (3...4 мин). Количество метанола вычисляли по уменьшению тока.

#### Л и т е р а т у р а

- Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1970, с.202 — 203.
- Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. Перевод с нем. Под ред.Е.Д. Левина. — М.: Мир, 1971, — 248 с.
- Симискер Я., Хейнару Э., Ныгес Т. Влияние концентрации метанола на скорость его усвоения и дыхания у метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii*. — Учен.зап.ТГУ, 1982, вып. 624. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Труды по микробиол., 3, с.5-20.

- Шолыц К.Р., Островский Д.Н. Ячейка для амперометрического определения кислорода. - В кн.: Методы современной биохимии. - М.: Наука, 1975, с. 52 - 58.
- Dijken, J.P., van, Otto, R., Harder, W. Growth of Hansenula polymorpha in a methanol-limited chemostat. - Arch. Microbiol., 1976, v. 111, p. 137 - 144.
- Eggeling, L., Sahm, H. Regulation of alcohol oxidase synthesis in Hansenula polymorpha: Oversynthesis during growth on mixed substrates and induction by methanol. - Arch. Microbiol., 1980, v. 127, p. 119 - 124.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction. - Biochem. J., v. 55, p. 416 - 421.
- Sahm, H., Wagner, F. Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. - Eur. J. Biochem., 1973, v. 36, p. 250 - 256.
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K. The microbial metabolism of methanol. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in methanol-utilizing yeast Kloeckera sp. No 2201. - Agr. Biol. Chem., 1972, v. 36, p. 68 - 75.

#### ESTIMATION OF METHANOL BY ALCOHOL OXIDASE

H. Teugjas, R. Kangur

#### S u m m a r y

A method is proposed for quantitative estimation of methanol by alcohol oxidase purified from Candida boidinii with DEAE cellulose column chromatography technique.

This method is based on methanol oxidation into formaldehyde by partly purified alcohol oxidase and on subsequent formaldehyde colorimetric estimation by the Nash reagent. The methanol concentration can also be determined polarographically by measuring oxygen consumption by the oxygen electrode.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ  
ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СУБСТРАТА  
У ДЕНИТРИФИКАТОРОВ

И. Ханно, Л. Кухлберг, Э. Таллсеп

Регуляция образования ферментов цитратного цикла как конечного механизма катаболизма энергетического субстрата определяется типом бактерий. У факультативного анаэроба *Escherichia coli* глюкоза частично подавляет образование ферментов цитратного цикла (Gray et al., 1966). У аэробных бактерий из рода *Pseudomonas* ферменты цитратного цикла являются конститутивными, и их образование не подвергается катаболитной репрессии глюкозой, в присутствии которого прекращается лишь образование транспортных систем, отвечающих за поступление промежуточных продуктов цитратного цикла в клетку (Tiwary, Campbell, 1969). Но опосредованная циклическим АМФ катаболитная репрессия образования ферментов цитратного цикла глюкозой обнаружена нами у денитрификатора с аэробным типом метаболизма *Bacterium agile* var. *hartlebil* в аэробных условиях культивирования (Кухлберг, Вязранд, 1981).

В настоящей работе мы представляем данные о влиянии глюкозы на образование ферментов цитратного цикла у *Bacterium agile* var. *hartlebil* в анаэробных условиях роста, а также о влиянии различных источников углерода на образование ферментов катаболизма энергетического субстрата у *Paracoccus denitrificans*.

Методика

Объектами исследования в настоящей работе явились *Bacterium agile* var. *hartlebil* ВКМ В-554 из всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов и *Paracoccus denitrificans* из коллекции Института микробиологии АН СССР.

Бактерии выращивали при 28° в литровых колбах при пос-

тоянной аэрации стерильным воздухом. Среда содержала следующие минеральные соли (г/л):  $\text{KNO}_3$  - 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  x 12  $\text{H}_2\text{O}$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4$  x 7 $\text{H}_2\text{O}$  - 2,0;  $\text{CaCl}_2$  - 0,1;  $\text{FeCl}_3$  - в следах. Источниками углерода являлись глюкоза, сукцинат или цитрат в концентрации 5 г/л. Начальная pH среды равнялась 7,4.

Для получения бесклеточных экстрактов клетки бактерий выделяли из питательной среды в середине логарифмической фазы роста культур центрифугированием на холоде при 8000g в течение 20 минут и промывали фосфатным буфером (50 мМ, pH 7,5). Промытые клетки замораживали и разрушали прессом типа Хьюза при  $-35^\circ$ . Клеточные осколки удаляли центрифугированием в холоде при 1800g в течение 20 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. Концентрацию белка в бесклеточном экстракте определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

Для определения активностей ферментов использовали следующие реакционные смеси:

Аконитат-гидратаза (КФ 4.2.1.3.) - фосфатный буфер, pH 7,4 - 50 мМ; цитрат натрия - 30 мМ; бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по образованию цис-аконитата регистрацией оптической плотности при 240 нм.

$\alpha$  - кетоглутаратдегидрогеназный комплекс - трис-буфер, pH 7,6 - 50 мМ;  $\alpha$  - кетоглутарат - 1 мМ; кофермент А - 0,1 мМ; НАД - 2 мМ; тиаминпирофосфат - 0,2 мМ; глутатион - 3 мМ;  $\text{MgCl}_2$  - 1 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции определяли по образованию НАДН регистрацией оптической плотности при 340 нм.

Сукцинатдегидрогеназа (КФ I.3.99.I) - фосфатный буфер, pH 7,6 - 100 мМ;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  - 0,5 мМ; сукцинат натрия - 20 мМ; KCN - 2 мМ; ЭДТА - 1 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по убыванию  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  регистрацией оптической плотности при 420 нм.

Фумарат - гидратаза (КФ 4.2.1.2.) - фосфатный буфер, pH 7,3 - 100 мМ; фумарат натрия - 25 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли по убыванию фумарата регистрацией оптической плотности при 300 нм.

Изоцитратдегидрогеназа (КФ I.I.I.4I) - фосфатный буфер, pH 7,4 - 50 мМ; изоцитрат натрия - 1,25 мМ;  $\text{MgCl}_2$  - 5 мМ; НАДФ - 0,2 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакции измеряли

по образованию НАДФН регистрацией оптической плотности при 340 нм.

Глюконат-6-фосфатдегидрогеназа (КФ I.I.I.43) - триэтанолламин буфер, pH 7,6 - 50 мМ; глюконат-6-фосфат натрия - 0,5 мМ; НАДФ - 0,31 мМ;  $MgCl_2$  - 0,1 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакций измеряли по образованию НАДФН регистрацией оптической плотности при 340 нм.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ I.I.I.49) - трис-буфер - 50 мМ, pH 8,7; глюкозо-6-фосфат натрия - 0,49 мМ; НАД или НАДФ - 0,1 и 0,31 мМ соответственно и бесклеточный экстракт. Скорость реакций измеряли по образованию НАДФН при 340 нм.

Малатдегидрогеназа (КФ I.I.I.37) - фосфатный буфер, pH 7,4 - 50 мМ; оксалоацетат - 1,5 мМ; НАДН - 0,4 мМ и бесклеточный экстракт. Скорость реакций измеряли по убыванию НАДН при 340 нм.

Активности ферментов выражали в наномолях продукта реакции, образующегося в течение 1 мин на 1 мг белка.

Влияние различных источников углерода (сукцинат и глюкоза) на образование дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и глюконат-6-фосфата исследовали в суспензиях клеток. Для получения суспензии клетки бактерии удаляли из среды в середине логарифмической фазы роста культур центрифугированием и промывали в фосфатном буфере (pH 7,4; 100 мМ). Промытые клетки суспендировали в свежей среде и в суспензию добавляли нужные источники углерода. Через определенные интервалы времени из суспензии брали пробы для определения активности ферментов.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования влияния глюкозы на образование ферментов цитратного цикла при анаэробном росте *Bacterium agile var. hartlebil* приведены в таблице I. Для сравнения там же приведены данные о зависимости образования ферментов цитратного цикла от источника углерода при аэробном росте бактерии.

Как видно из представленных данных, при выращивании *Bacterium agile var. hartlebil* в анаэробии в присутствии нитрата активности ферментов цитратного цикла более низкие, чем при выращивании бактерий в аэробии. При этом уменьше-

Таблица I

Удельные активности ферментов цитратного цикла ( $\text{нмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ) в бесклеточных экстрактах *Bacterium agile* var. *hartlebilii*, выращенных на средах с сукцинатом и глюкозой в аэробносе и анаэробносе.

	Аэробносе			Анаэробносе		
	среда с сукцинатом а	среда с глюкозой б	а/б	среда с сукцинатом а	среда с глюкозой б	а/б
Сукцинатдегидрогеназа	26,2 ± 1,5	16,6 ± 1,3	1,6	9,2 ± 2,2	7,8	1,2
Фумарат-гидратаза	1225,0 ± 142,0	323,0 ± 154,0	3,8	242,0 ± 80,0	163,0 ± 13,4	1,5
Аконитат-гидратаза	45,0 ± 5,3	54,0 ± 8,9	0,8	25,1 ± 7,8	31,0 ± 1,5	0,8
Малатдегидрогеназа	4282,0	821,0 ± 86,0	5,2	1377,0 ± 414,0	1693,0	0,8
α - кетоглутаратдегидрогеназа	49,2	7,9	6,2	н.о.	14,7	

н.о. - не определяли

ие активностей ферментов цитратного цикла в анаэробнозе, по сравнению с аэробнозом, **выражается на среде с сукцинатом сильнее (в 2...5 раз), чем на среде с глюкозой (до 2 раз).** Интересно, что в анаэробнозе в условиях денитрификации образование ферментов цитратного цикла практически не подавляется глюкозой.

Но уменьшение активности ферментов цитратного цикла у *Bacterium agile var. hartlebil* не показывает, по-видимому, уменьшения энергетической функции цикла. Бактерии с аэробным типом метаболизма окисляют источники углерода до  $CO_2$  и  $H_2O$  и при денитрификации в анаэробных условиях, что указывает на функционирование цитратного цикла. В этом отношении денитрификаторы с аэробным типом метаболизма отличаются от факультативных анаэробов, у которых при нитратном дыхании функционирование цитратного цикла подавлено, и в среду накапливается ацетат (Forget, Pichinoty, 1964; Yamamoto, Ishimoto, 1975).

Бесклеточные экстракты денитрификаторов с аэробным типом метаболизма катализируют восстановление нитрата в присутствии различных промежуточных продуктов цитратного цикла (Lam, Nicholas, 1969) и в культуре этих бактерий обнаруживается накопление ацетата лишь при ингибировании цитратного цикла фторацетатом (Симискер и др., 1975).

Низкие активности ферментов цитратного цикла у *Bacterium agile var. hartlebil* в анаэробнозе в присутствии нитрата, по-видимому, являются одной из причин медленного роста этой бактерии в условиях денитрификации. Выход АТФ при денитрификации ниже, чем при кислородном дыхании (Philip, Whatley, 1970). Для обеспечения синтеза одинакового количества биомассы при денитрификации в цитратном цикле должно окисляться большее количество энергетического субстрата, чем при кислородном дыхании. Уменьшение активности ферментов цитратного цикла при переходе к денитрификации должно вести к понижению скорости роста.

У *Paracoccus denitrificans* источник углерода в питательной среде, по-видимому, существенно не влияет на уровень ферментов цитратного цикла в клетках (табл. 2).

Таблица 2

Активности ферментов цитратного цикла (нмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>) в бесклеточных экстрактах *Paracoccus denitrificans*, выращенных в среде с глюкозой, сукцинатом и цитратом.

Фермент	Источник углерода		
	сукцинат	цитрат	глюкоза
Сукцинатдегидрогеназа	21	29	33
Фумарат-гидратаза	512	1587	552
Аконитат-гидратаза	46	106	110
Изоцитратдегидрогеназа	-	449	329

(-) - не определяли

Активности основных ферментов цитратного цикла в клетках *Paracoccus denitrificans*, выращенных на средах с сукцинатом, цитратом или глюкозой, мало различаются между собой. Это позволяет заключить, что образование ферментов цитратного цикла у *Paracoccus denitrificans* не подвергается катаболитной репрессии глюкозой. По указанной особенности регуляция образования ферментов цитратного цикла у *Paracoccus denitrificans* отличается от *Bacterium agile* var. *hartleebii*, у которого глюкоза частично подавляет образование этих ферментов (Кухлберг, Вязранд, 1981). Конститутивный характер синтеза ферментов цитратного цикла является характерным для строгих аэробов (Tiwary, Campbell, 1969).

У *Paracoccus denitrificans* органические кислоты служат, по-видимому, более выгодными источниками углерода, чем глюкоза, и они подавляют синтез ферментов катаболизма глюкозы (табл. 3). Как видно из представленных данных (табл. 3), образование НАД- и НАДФ-зависимых глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ индуцируется переходом клеток на использование глюкозы. Образование этих дегидрогеназ подавляется сукцинатом также в присутствии глюкозы. В то же время образование НАДФ-зависимой глюконат-6-фосфатдегидрогеназы меньше или вообще не зависит от источника углерода в среде.

Возможно, что физиологической причиной подавления образования ферментов катаболизма глюкозы органическими кислотами у *Paracoccus denitrificans* является функционирование

Таблица 3

Динамика активностей (нмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>) дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и глюконат-6-фосфата у *Paracoccus denitrificans* при переходе клеток, выращенных на среде с сукцинатом, на среды с различными источниками углерода.

Фермент	Источники углерода в среде и время адаптации								
	сукцинат			глюкоза			сукцинат и глюкоза		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
НАДФ-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	13	15	10	13	69	135	13	14	54
НАД-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	5	1	1	5	9	39	5	2	16
НАДФ-зависимая глюконат-6-фосфатдегидрогеназа	10	13	7	10	11	7	10	8	19

Таблица 4

Влияние малоната (20мМ) и АТФ (2мМ) на образование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (нмоль х мин<sup>-1</sup> х мг<sup>-1</sup>) в суспензиях клеток *Paracoccus denitrificans*, выращенных на среде с сукцинатом, после перевода клеток на среды с различными источниками углерода.

74

Глюкозо-6- фосфатдегидрогеназа	Состав среды и время (часы) инкубирования														
	сукцинат			глюкоза			глюкоза и сукцинат			глюкоза, сукцинат, малонат			глюкоза и АТФ		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12
НАДФ-зависимая	13	12	9	13	43	47	13	13	27	13	13	20	13	50	40
НАД-зависимая	4	4	3	4	18	23	4	7	15	4	5	10	4	16	19

Таблица 5

Влияние 2,4-динитрофенола (0,2мМ) и АТФ (2мМ) на образование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ( $\mu\text{моль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ ) в суспензиях клеток *Paracoccus denitrificans*, выращенных на среде с сукцинатом, после перевода клеток на среды с различными источниками углерода.

Глюкозо-6- фосфатдегид- рогеназа	Состав среды, время (часы) инкубирования							
	глюкоза		глюкоза и сукцинат		глюкоза, сукцинат, 2,4-динитрофенл		глюкоза и АТФ	
	0	6	0	6	0	6	0	6
НАД-зависимая	7	35	7	22	7	6	7	35
НАДФ-зависимая	5	22	5	10	5	2	5	15

пути Энтнера-Дудорова, который характеризуется более низким выходом АТФ, чем гликолиз.

Механизмы индукции и репрессии синтеза ферментов у строгих аэробов, катаболизирующих глюкозу через путь Энтнера - Дудорова, слабо изучены. У *Pseudomonas* MA образование изоцитрат-лиазы контролируется внутриклеточным уровнем циклического АМФ (Bellion, Kim, 1978). У факультативных анаэробов регуляция внутриклеточного уровня циклического АМФ осуществляется при помощи ПЭП-зависимой транспортной системы глюкозы (Saler et al., 1976; Harwood et al., 1976). Вышеуказанная транспортная система глюкозы у строгих аэробов, катаболизирующих глюкозу через путь Энтнера-Дудорова, отсутствует, и предполагается, что у последних внутриклеточный уровень циклического АМФ определяется трансмембранным градиентом водородных ионов, величина которого зависит от концентрации АТФ в клетках (Fitzgerald et al., 1978).

Для проверки вышеуказанной гипотезы мы исследовали у *Paracoccus denitrificans* влияние малоната и 2,4-динитрофенола на образование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при одновременном присутствии в среде сукцината и глюкозы (табл. 4 и 5). Как видно из представленных данных, ингибирование цитратного цикла малонатом и разобщение окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом не оказали существенного влияния на образование НАД- и НАДФ-зависимых глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ. Добавление АТФ в суспензию клеток в присутствии глюкозы не подавляло образования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Оба использованных ингибитора (малонат и 2,4-динитрофенол) должны уменьшать концентрацию АТФ в клетках. Эти результаты показывают, что ингибирование образования АТФ у *Paracoccus denitrificans* не удаляет репрессирующего эффекта сукцината на образование дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата.

Однако надо учитывать, что в опытах с суспензиями клеток всегда встречается ряд неопределенностей (неспецифические эффекты ингибиторов, проницаемость субстратов в клетку и т.д.), что осложняет однозначную интерпретацию результатов.

#### Заключение

Механизмы регуляции образования ферментов цитратного цикла у денитрификаторов аэробного типа метаболизма зависят

от типа бактерии. У *Bacterium agile* var. *hartlebilii* образование ферментов цитратного цикла подвергается катаболитной репрессии глюкозой. У *Parasoccus denitrificans* уровень ферментов цитратного цикла в клетках не зависит от источника углерода, и их образование носит конститутивный характер. Промежуточные продукты цитратного цикла - сукцинат и цитрат у *Parasoccus denitrificans* подавляют синтез ферментов катаболизма глюкозы. Предполагается, что индуцируемый или конститутивный характер образования ферментов цитратного цикла у денитрификаторов зависит от типа первичного метаболизма глюкозы.

#### Л и т е р а т у р а

- Кухлберг Л., Вяэранд Р. Влияние экзогенного циклического аденозинмонофосфата на образование ферментов цикла трикарбоновых кислот у денитрификатора *Bacterium agile* var. *hartlebilii*. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып. 583. Экспрессия генетической информации и дифференцировка клеток. Труды по цитол. и генетике, 3, с. 63-69.
- Симискер Я., Кухлберг Л., Рулл Э. Использование глюкозы денитрифицирующей бактерией *Achromobacter agile*. - Учен. зап. ТГУ, 1975, вып. 352. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Труды по микробиол., 2, с. 66-73.
- Bellion, E., Kim, Yu Sam. Catabolite repression of isocitrate lyase in methylamine-grown *Pseudomonas* MA. Effect of carbon and nitrogen sources. - Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 541, p. 425 - 434.
- Fitzgerald, J.W., Kight - Oliff, L.C., Stewart, G. J., Benachamp, N.F. Reversal of succinate-mediated catabolite repression of alkyl-sulfatase in *Pseudomonas aeruginosa* by 2,4-dinitrophenol and by sodium malonate. - Can. J. Microbiol., 1978, v. 24, p. 1567 - 1573.
- Forget, P., Pichinoty, F. Influence de la respiration anaerobic du nitrate et du fumarate sur le metabolisme fermentaire d' *Aerobacter aerogenes*. - Biochim. Biophys. Acta, 1964, v. 82, p. 441 - 444.
- Gray, C.T., Wimpenny, J.W.T., Mossman, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II Effects of aerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. - Biochim. Biophys. Acta, 1966, v. 117, p. 33 - 41.

- Harwood, J.P., Cazdar, C., Prasad, C., Peterkofsky, A., Curtis, S.J., Epstein, W. Involvement of the glucose enzymes II of the sugar phosphotransferase system in the regulation of adenylate cyclase by glucose in Escherichia coli. - J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 2462 - 2468.
- Lam, Y., Nicholas, D.J.D. Aerobic and anaerobic respiration in Micrococcus denitrificans. - Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 172, p. 450 - 462.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, K. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - J. Biol. Chem., v. 193, p. 265 - 275.
- Philip, J., Whatley, F.R. Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in Micrococcus denitrificans. - Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 210, p. 237 - 452.
- Saier, M.H., Feucht, B.U., Hofstadter, L.J. Regulation of carbohydrate uptake and adenylate cyclase activity mediated by the Enzyme II of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in Escherichia coli. - J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 883 - 892.
- Tiwary, N.P., Campbell, J.J.R. Enzymatic control of the metabolic activity of Pseudomonas aeruginosa grown in glucose or succinate media. - Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 192, p. 395 - 401.
- Yamamoto, J., Ishimoto, M. Effect of nitrate reduction on the enzyme levels in carbon metabolism in Escherichia coli. - J. Biochem., 1975, v. 78, p. 307 - 315.

EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE FORMATION OF  
CATABOLIZING ENZYMES IN DENITRIFYING BACTERIA

I. Henno, L. Kuhlberg, E. Talpsep

S u m m a r y

The present paper describes the effect of different carbon sources on the formation of enzymes of the citric acid cycle in two denitrifying bacteria.

In Bacterium agile var. hartleebii the formation of enzymes of the citric acid cycle is repressed by glucose. In *paracoccus denitrificans* the synthesis of the corresponding enzymes is not subject to repression by carbon source. Moreover, succinate and citrate are known to inhibit the synthesis of glucose catabolizing enzymes.

It is supposed that the pathway of primary glucose metabolism may be responsible for either constitutive or inductive formation of the citric acid cycle enzymes in these bacteria.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ  
ШТАММОВ БАКТЕРИЙ С ПЛАЗМИДАМИ БИОДЕГРАДАЦИИ,  
КОНТРОЛИРУЮЩИХ ОКИСЛЕНИЕ НАФТАЛИНА И САЛИЦИЛ-  
ЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Л. Касак, А. Хейнару

Известно, что нафталин окисляется до салициловой кислоты у бактерий в результате пяти последовательных реакций (Davies, Evans, 1964). В процессе трансформации нафталина в салициловую кислоту происходит отщепление  $C_3$ -фрагмента с образованием пирувата, которая является хорошим субстратом для роста бактерий. Салициловая кислота в свою очередь превращается в катехол - в центральный промежуточный продукт разложения ароматических соединений у псевдомонад (Wheeler, 1975). Далее расщепление фенольного кольца катехола происходит двумя способами - с помощью фермента катехол-1,2-диоксигеназы по орто-пути или катехол-2,3-диоксигеназой по мета-пути (Sala-Trepat, Evans, 1971; Murray et al., 1972). Для псевдомонад описан еще способ трансформации салициловой кислоты через гентизиновый путь метаболизма (Скрябин, Старовойтов, 1975).

У некоторых штаммов почвенных псевдомонад трансформация нафталина и салициловой кислоты определяется плазмидами биодеградации, обозначенными  $NaN$ - и  $SAL$ -плазмидами (Chakrabarty, 1972; Dunn, Gunsalus, 1973). В настоящее время в литературе опубликованы следующие типы  $NaN$ - и  $SAL$ -плазмид:

1. Нафталиновые плазмиды  $NaN$  (Dunn, Gunsalus, 1973) и  $pBS3$  (Боронин и др., 1977а), определяющие катаболизм нафталина через салициловую кислоту до катехола и дальнейшее разложение катехола через мета-путь.

2. Нафталиновая плазида  $pBS2$ , определяющая разложение нафталина через салициловую кислоту до катехола с последующим расщеплением катехола через орто-путь метаболизма (Ста-

ройтов и др., 1976; Боронин и др., 1977а; Старовойтов, Тимкина, 1981).

3. Нафталиновые плазмиды *NPL-I* и *NPL-4I*, определяющие окисление нафталина до салициловой кислоты (Боронин и др., 1976, 1977б).

4. Нафталиновая плазида *pBS4*, определяющая разложение нафталина через салициловую кислоту с последующим расщеплением этого соединения через гентезиновую кислоту в качестве промежуточного продукта (Кочетков и др., 1979).

5. Салицилатные плазмиды *SAL* (Chakrabarty, 1972) и *pMWD-I* (Zuniga et al., 1981), контролирующие окисление салициловой кислоты до катехола с последовательным расщеплением этого соединения через мета-путь.

Следует отметить, что у некоторых бактерий как нафталиновые, так и салицилатные гены могут локализоваться на хромосоме бактерий. Так, например, в штамме *Pseudomonas putida* I2A, содержащем нафталиновую плазмиду *NPL-I*, салицилатные гены (Боронин и др., 1977б), а в штамме *Ps. putida* *pMD-I*, содержащем *SAL*-плазмиду *pMWD-I*, нафталиновые гены имеют хромосомную локализацию (Zuniga et al., 1981).

В настоящей работе представлены предварительные генетические и биохимические данные по изучению экспрессии плазмидоспецифических признаков у местных *NAH<sup>+</sup>* и *SAL<sup>+</sup>* штаммов псевдомонад.

#### Материал и методика

Бактериальные штаммы. Генетическая характеристика и происхождение бактериальных штаммов, использованных в работе, даны в таблицах 1 и 2.

Среды. В качестве полноценной среды использовали бульон Луриа (пептон "Дифко" - 10, дрожжевой экстракт "Дифко" - 5, NaCl - 5 г/л воды). Агаризованные среды содержали 1,5% агара "Дифко". В качестве минеральной среды использовали среды M9 и Спицайзена (Duggleby et al., 1977). В среду Спицайзена цитрата натрия не добавляли, так как псевдомонады растут на этом соединении. Состав минеральных сред, содержание микроэлементов и способ приготовления описаны нами ранее (Кильк и др., 1981).

Таблица I

## Стандартные штаммы, использованные в работе

№№ ПП	Вид бактерий	Штамм	Генотип <sup>Х</sup>	Источник получения штамма
1.	<i>Ps. putida</i>	PrG7 (ATCC17485)	Прототроф; NAH	П.Брода (Англия)
2.	<i>Ps. putida</i>	NCIB9816	Прототроф; NAH-2	П.Брода (Англия)
3.	<i>Ps. aeruginosa</i>	ACI65	Прототроф; SAL	П.Брода (Англия)
4.	<i>Ps. putida</i>	mt-2PaW340	trp, str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия)
5.	<i>Ps. putida</i>	ACIO	met, str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия); str <sup>r</sup> спонтанно, настоящая работа
6.	<i>Ps. putida</i>	AC34	ade, str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия); str <sup>r</sup> спонтанно, настоящая работа
7.	<i>Ps. aeruginosa</i>	PAOI670	ade, leu, rif <sup>r</sup>	П.Брода (Англия)
8.	<i>Ps. aeruginosa</i>	PAO2QOI	arg, str <sup>r</sup>	Б.Холлвеи (Австралия)
9.	<i>Ps. aeruginosa</i>	PAO2QO3	arg, str <sup>r</sup> , recA	Б.Холлвеи (Австралия)
10.	<i>Ps. aeruginosa</i>	ML4262	ile, met, val, trp, his, rif <sup>r</sup>	А.Боронин (г. Пу- щино)

<sup>Х</sup> Обозначения соответствуют номенклатуре, принятой Новиком с соавторами (Novick et al., 1976).

Таблица 2

## Местные штаммы, использованные в работе

№№ ПП	Вид бактерий	Штамм	Генотип
I.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-1	Прототроф; SalI-1
2.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-2	Прототроф; SalI-2
3.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-3	Прототроф; SalI-3
4.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-4	Прототроф; SalI-4
5.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-5	Прототроф; SalI-5
6.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-6	Прототроф; SalI-6
7.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-7	Прототроф; SalI-7
8.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-8	Прототроф; SalI-8
9.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-9	Прототроф; SalI-9
10.	<i>Ps. putida</i>	AHS-I-10	Прототроф; SalI-10
II.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-1	Прототроф; NahI-1
12.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-2	Прототроф; NahI-2
13.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-3	Прототроф; NahI-3
14.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-4	Прототроф; NahI-4
15.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-5	Прототроф; NahI-5
16.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-6	Прототроф; NahI-6
17.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-7	Прототроф; NahI-7
18.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-8	Прототроф; NahI-8
19.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-9	Прототроф; NahI-9
20.	<i>Ps. aeruginosa</i>	AHN-I-10	Прототроф; NahI-10

Необходимые аминокислоты и азотистые основания вносили в среду в конечной концентрации 20 мкг/мл, а сукцинат, салицилат или бензонат (натриевые соли, фирма "Koch-Light", Англия) - в качестве источников углерода и энергии - 5мМ. При применении твердых минеральных сред нафталин добавляли в виде субстанции на внутренней поверхности перевернутых чашек Петри. При аэрации культур в жидкой среде стерильный воздух обогащали в случае нафталина этим эвапорирующим соединением. Глюкозу добавляли в среду в конечной концентрации 0,2%.

Лекарственные вещества. В работе применяли отечественный препарат стрептомицин сульфата и рифампицин ("Serva", ФРГ).

Видовая принадлежность бактерий. Видовую принадлежность у изолированных нами местных штаммов бактерий определяли по общепринятой методике (Stanier et al., 1966).

Элиминация плазмид биодеградации. Элиминацию плазмидных признаков изучали по общепринятой методике (Williams, Worsey, 1976). У  $SAL^+$  бактерий элиминацию плазмидных признаков изучали в L-среде при 28°C и при 37°C и при росте бактерий на бензоате. У  $NaN^+$  бактерий элиминацию  $NaN^-$  и  $SAL^-$  признаков изучали в L-среде и при росте бактерий на нафталине и салицилате.

Изучение трансмиссивности плазмид биодеградации. Скрещивания бактерий провели на поверхности питательной среды в чашках Петри. 0,1 мл донорной культуры было нанесено на отмеченные места в чашках Петри с L-средой, где заранее была высеяна культура реципиента. После 4- и 16-часовой инкубации сделали пересевы методом реплик на селективные среды. Для селекции трансконъюгантов были использованы различия штаммов-доноров и -реципиентов в резистентности к стрептомицину (1000 мкг/мл) или рифампицину (100 мкг/мл) и по одному плазмидному признаку ( $NaN^+$ ,  $SAL^+$ ). Потенциальные рекомбинанты очистили на селективных средах того же состава, после чего определяли наличие неселективных маркеров и свойств штаммов бактерий, участвующих в процессе конъюгации. Передача хромосомных маркеров не изучалась.

Определение активности плазмидоспецифических ферментов. Активности катехол-1,2-диоксигеназы и катехол-2,3-диоксигеназы определяли по ранее нами описанным методам (Кильк

и др., 1982) спектрофотометрически на приборе Perkin Elmer Model 553.

Выделение плазмидной ДНК. Плазмидная ДНК была изолирована по методу Хансена и Ольсена (Hansen, Olsen, 1978) и очищена при центрифугировании в градиенте  $\text{CsCl}$  на центрифуге Beckman L8-65, вертикальный ротор T145.

Электрофорез плазмидной ДНК. Гель-электрофорез плазмидной ДНК проводили в 0,6%-ном агарозном геле ("Sigma", США) в трис-боратном буфере (Eckhardt, 1978).

### Результаты и обсуждение

Изучаемые в данной работе местные штаммы бактерий, способные расти на нафталине ( $\text{NaN}^+$ ) и салицилате ( $\text{SAL}^+$ ), были выделены в 1979 году из одной почвенной пробы в накопительных культурах. В ходе исследований этих штаммов бактерий было высказано предположение о плазмидной обусловленности  $\text{NaN}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков (Хейнару и др., 1979). В опытах по конъюгации удалось осуществить передачу  $\text{NaN}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков на реципиентные штаммы псевдомонад (табл. 3). При этом передача  $\text{NaN}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков как от местных, так и от стандартных штаммов псевдомонад происходила только на некоторые реципиентные штаммы. Так,  $\text{SAL}^+$  признак передавался штаммам реципиентам *Ps. aeruginosa* PAO 2001 и ML4262, но не передавался штаммам реципиентам *Ps. putida* Paw340, AC10 и AC34. Передачи  $\text{NaN}^+$  признака удалось получить шестью штаммами из десяти изученных. Отсутствие передачи в процессе конъюгации  $\text{NaN}^+$  признака из местных штаммов АНН-1-2, АНН-1-4, АНН-1-5 и АНН-1-8 можно объяснить несколькими причинами, среди которых главной может оказаться высокая нестабильность  $\text{NaN}^+$  фенотипа у донорных бактерий.

Из всех штаммов была выделена плазмидная ДНК, которая по электрофоретическим данным имела одинаковую подвижность, характерную для всех местных  $\text{SAL}^+$  и  $\text{NaN}^+$  штаммов бактерий. У всех штаммов была выявлена только одна полоса плазмидной ДНК при гель-электрофорезе (табл. 3). Хотя нами еще не поставлены опыты по трансформации  $\text{NaN}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков с выделенными плазмидными ДНК-ами, вышеприведенные данные дают основу предполагать наличия  $\text{NaN}^-$  и  $\text{SAL}^-$  плазмид у всех изученных в работе местных штаммов псевдомонад.

В связи с тем, что местные  $\text{SAL}^+$  штаммы были выделены в

средах с салицилатом и  $\text{NaN}^+$  бактерий в средах с нафталином как на единственном источнике углерода, можно предполагать, что все  $\text{SAL}^+$  и все  $\text{NaN}^+$  культуры являются субкультурами первоначальных  $\text{SAL}^+$  и  $\text{NaN}^+$  бактерий. Опыты по передаче  $\text{NaN}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков в процессе конъюгации, наличие одностипной плазмидной ДНК и одинаковая видовая принадлежность подтверждают сказанное. С другой стороны, так как салициловая кислота является промежуточным продуктом разложения нафталина, не исключено, что выделенные нами  $\text{SAL}^+$  бактерий являются производными первоначальных  $\text{NaN}^+$  бактерий, потерпевших изменения, в ходе чего происходило выщепление из  $\text{NaN}$ -плазмиды генов, ответственных за разложения нафталина до салициловой кислоты. Для выяснения этого предположения нами была изучена стабильность  $\text{NaN}$ - и  $\text{SAL}$ -плазмид у местных штаммов псевдомонад и определена активность некоторых ключевых ферментов метаболизма катехола.

У всех  $\text{SAL}^+$  бактерий  $\text{SAL}^+$  признак являлся высокостабильным. Только при росте бактерий при  $37^\circ\text{C}$  значительная часть  $\text{SAL}^+$  бактерий оказалась фенотипически  $\text{SAL}^-$ . При последующем изучении этих  $\text{SAL}^-$  бактерий в большинстве случаев были получены  $\text{SAL}^+$  ревертанты. Следовательно, при повышенной температуре салицилатные гены не экспрессируются, причем задержка их экспрессии продолжается в течение нескольких пассажей при оптимальной температуре роста бактерий. Неожиданно все стабильные  $\text{SAL}^-$  клоны оказались неспособными расти на бензоате ( $\text{BEN}^-$ ) (табл. 4).

На основе наших знаний по метаболизму ароматических соединений у почвенных псевдомонад трудно объяснить образование  $\text{SAL}^- \text{BEN}^-$  фенотипа. Общеизвестно, что подавляющее большинство сапрофитных псевдомонад имеет хромосомные гены, определяющие у бактерий способность роста на бензоате (Ornston, 1966). В литературе описаны случаи образования  $\text{BEN}^-$  фенотипа на уровне мутации в генах, определяющих проницаемость ароматических соединений через мембранные структуры бактерий и восстановление способности роста бактерий на бензоате за счет плазмид типа  $\text{RP4}$  (Farrell, Chakrabarty, 1979). Аналогично найдены  $\text{Alk}^-$  мутантные штаммы псевдомонад, у которых  $\text{Alk}^-$  фенотип обусловлен не отсутствием соответствующего фермента, а изменениями в строении мембранных структур (Fennewald et al., 1978). Вполне вероятно, что образование  $\text{BEN}^-$  фенотипа должно иметь общую обусловленность у псев-

Таблица 3

Передача  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков в процессе конъюгации  
на разные штаммы реципиенты

Штаммы бактерий	Передача в процессе конъюгации на							Плазмидная ДНК (число по- люс)
	Ps. putida			Ps. aeruginosa				
	Рав340	AC10	AC34	PAO 1670	PAO 2001	PAO 2003	4262	
Ps. putida AHS-I-1	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. putida AHS-I-2	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. putida AHS-I-3	-	-	-	-	+	-	+	I
Ps. putida AHS-I-4	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. putida AHS-I-5	-	-	-	-	+	+	+	I
Ps. putida AHS-I-6	-	-	-	-	+	-	+	I
Ps. putida AHS-I-7	-	-	-	-	+	-	+	I
Ps. putida AHS-I-8	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. putida AHS-I-9	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. putida AHS-I-10	-	-	-	-	-	-	+	I
Ps. aeruginosa AC165	-	-	-	-	+	+	+	I
Ps. aeruginosa AHN-I-1	-	-	+	-	-	-	-	I
Ps. aeruginosa AHN-I-2	-	-	-	-	-	-	-	I
Ps. aeruginosa AHN-I-3	-	-	-	-	+	+	+	I
Ps. aeruginosa AHN-I-4	-	-	-	-	-	-	-	I
Ps. aeruginosa AHN-I-5	-	-	-	-	-	-	-	I
Ps. aeruginosa AHN-I-6	-	-	+	-	+	+	+	I
Ps. aeruginosa AHN-I-7	-	-	+	-	+	+	+	I
Ps. aeruginosa AHN-I-8	-	-	-	-	-	-	-	I
Ps. aeruginosa AHN-I-9	-	-	+	-	+	-	+	I
Ps. aeruginosa AHN-I-10	-	-	+	-	-	-	-	I
Ps. putida PpG7	-	-	-	-	+	-	+	I

"+" - передача  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков

"-" - отсутствие передачи  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков

Таблица 4

Частота элиминации  $SAL^+$  и  $BEN^+$  признаков у местных штаммов псевдомонад<sup>X</sup>

штаммы бактерий	Частота элиминации $SAL^+$ фенотипа (в %-ах) при росте бактерий на L - среде		Элиминанты с фенотипом $SAL^- BEN^+$ , давшие ревертаны $SAL^+ BEN^+$	Элиминанты с фенотипом $SAL^- BEN^-$ (число выявленных клонов)	
	при 28°C	при 37°C		$SAL^- BEN^-$	$SAL^- BEN^-$
<i>Ps. putida</i> AHS-I-1	I	33	30	3	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-2	I	3	3	0	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-3	I	16	14	2	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-4	I	2	2	0	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-5	I	3	1	2	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-6	I	6	5	1	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-7	I	3	3	2	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-8	I	2	2	0	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-9	I	3	3	0	0
<i>Ps. putida</i> AHS-I-10	I	91	88	3	0
<i>Ps. aeruginosa</i> ACT165 $SAL^+$	I				

<sup>X</sup> Способность роста на салицилате ( $SAL^+$ ) и бензоате ( $BEN^+$ )

домонад, имеющих плазмиды биодеградации. В наших опытах с TOL-плазмидами сравнительно часто некоторые TOL<sup>-</sup> элиминанты являются фенотипически  $BEN^-$ . Суммируя вышесказанное можно предполагать, что  $BEN^-$  фенотип образуется не в результате мутации в соответствующем хромосомном гене, а на уровне мембранных структур бактерий, проницаемость которых может измениться при элиминации плазмид, в данном случае  $SAL^-$  плазмид.

В отличие от  $SAL^+$  бактерий  $NAH^+$  признак у  $NAH^+$  бактерий являлся чрезвычайно нестабильным (табл. 5). При росте  $NAH^+$  бактерий на салицилате  $NAH^+$  признак элиминируется необратимо из всех бактерий. В неселективных средах было отмечено образование клонов с фенотипом  $NAH^+SAL^-$  с высокой частотой. Среди элиминантов были найдены еще клоны с фенотипами  $NAH^-SAL^-BEN^+$ ,  $NAH^-SAL^+BEN^+$  и  $NAH^-SAL^-BEN^-$ . Эти данные приводят к мысли, что *Nab*- и *Sal*-гены и гены, ответственные за явление  $BEN^+$  фенотипа, должны локализоваться в  $NAH$ -плазмиде в разных оперонах, причем активность соответствующих оперонов регулируется регуляторными генами, находящимися в этой же плазмиде. Аналогичные выводы были сделаны недавно при изучении *TOL*-плазмиды *pWWO* (Franklin et al., 1981) и *OCT*-плазмиды (Fennewald et al., 1979).

Изученные в данной работе местные  $NAH^+$  бактерии дали сразу же после выделения хороший рост в средах с нафталином и характерную оранжевую окраску колоний при длительной инкубации бактерий. В ходе постоянных пересевов в течение трех лет только два штамма ( $\Delta HN-I-3$  и  $\Delta HN-I-4$ ) сохранили выше-названные свойства. Одна культура ( $\Delta HN-I-7$ ) сохранила способность быстрого роста на нафталине, но не дала пигментацию колоний. Остальные же семь культур стали расти на нафталине очень медленно. Опыты показали, что эти культуры сохраняли в клетках бактерий плазмидную ДНК, передавали  $NAH^+$  признак в процессе конъюгации к реципиентным штаммам псевдомонад и давали совпадающие результаты в тестах по элиминации. После роста одного из медленно растущих штаммов ( $\Delta HN-I-6$ ) в жидкой селективной среде этот штамм дал снова большие пигментированные колонии на селективных средах. Следовательно, медленно растущий на нафталине фенотип должен иметь регуляторный характер. В определенных условиях восстанавливается полная экспрессия  $NAH$ -плазмидных генов. Хотя наши данные не дают прямых оснований предполагать переход плазмидных оперонов в хромосому бактерий, такая возможность кажется нам вполне реальной.

У  $SAL^+$  и  $NAH^+$  бактерий была определена активность катехол-1,2- и катехол-2,3-диоксигеназ (табл. 6). Все  $SAL^+$  бактерии выявляли активность только катехол-1,2-диоксигеназ. Если  $SAL^+$  признак в изученных  $SAL^+$  бактериях действительно плазмидный, то эти плазмиды являются первыми  $SAL$ -плазмидами, определяющими разложение катехола через орто-путь метаболизма.

Таблица 5

Частота элиминации  $\text{NAH}^+$ ,  $\text{SAL}^+$  и  $\text{BEN}^+$  признаков у местных  $\text{NAH}^+$  штаммов псевдомонад<sup>x</sup>

Штаммы бактерий	Частота элиминации $\text{NAH}^+$ и $\text{SAL}^+$ признаков (в %-ах) при росте бактерий на				ФЕНОТИП КОЛОНИИ (в %-ах)				
	салицилате		L -среде		$\text{NAH}^+$	$\text{NAH}^+$	$\text{NAH}^-$	$\text{NAH}^-$	$\text{NAH}^-$
	$\text{SAL}^+$	$\text{SAL}^-$	$\text{SAL}^+$	$\text{SAL}^-$	$\text{SAL}^+$	$\text{SAL}^-$	$\text{SAL}^+$	$\text{SAL}^-$	$\text{SAL}^-$
	$\text{BEN}^+$	$\text{BEN}^-$	$\text{BEN}^+$	$\text{BEN}^-$	$\text{BEN}^+$	$\text{BEN}^-$	$\text{BEN}^+$	$\text{BEN}^-$	$\text{BEN}^-$
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-1	100	0	99	75	I	0	28	71	0
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-2	100	0	100	60	0	0	40	60	0
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-3	100	0	54	40	I5	3I	45	6	3
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-4	100	0	53	38	I7	30	45	3	5
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-5	100	0	82	100	0	I8	0	82	0
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-6	100	0	27	60	I9	55	2I	3	2
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-7	100	0	55	49	I	3	7	45	3
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-8	100	0	80	98	0	20	2	78	0
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-9	100	0	83	88	0	I7	I2	7I	0
<i>Ps. aeruginosa</i> AHN-I-10	100	0	86	98	I	I3	I	75	0
<i>Ps. putida</i> PpG7 $\text{NAH}^+$			0	0					
<i>Ps. putida</i> NCIB9816			4	4					

<sup>x</sup>Способность роста на нитратине ( $\text{NAH}^+$ ), салицилате ( $\text{SAL}^+$ ) и бензоате ( $\text{BEN}^+$ )

Активности катехол-1,2- и -2,3-диоксигеназ у  
местных  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  штаммов псевдомонад

Штаммы бактерий	Активность катехолдиоксигеназ (мкмоль/ мин на 1 мг сухого веса бактерий на					
	нафталине		салицилате		бензоате	
	K120 <sup>X</sup>	K230 <sup>XX</sup>	K120	K230	K120	K230
Ps. putida AHS-1-1	-	-	0,1790	0,0000	0,0390	0,0000
Ps. putida AHS-1-2	-	-	0,0116	0,0000	0,1180	0,0000
Ps. putida AHS-1-3	-	-	0,0390	0,0000	0,0222	0,0000
Ps. putida AHS-1-4	-	-	0,0240	0,0000	0,0215	0,0000
Ps. putida AHS-1-5	-	-	0,0450	0,0000	0,1630	0,0000
Ps. putida AHS-1-6	-	-	0,0890	0,0000	0,0300	0,0000
Ps. putida AHS-1-7	-	-	0,0510	0,0000	0,0180	0,0000
Ps. putida AHS-1-8	-	-	0,2200	0,0000	0,0326	0,0000
Ps. putida AHS-1-9	-	-	0,0316	0,0000	0,0232	0,0000
Ps. putida AHS-1-10	-	-	0,0715	0,0000	0,0450	0,0000
Ps.aeruginosa AC165	-	-		0,0930		
Ps.aeruginosa AHN-1-3	-	0,0100	0,0230	0,0490	0,0400	0,0030
Ps.aeruginosa AHN-1-4	0,0820	0,0080	0,1720	-	0,0770	-
Ps.aeruginosa AHN-1-6	-	0,0100	0,0400	0,0700	0,0320	0,0040
Ps.aeruginosa AHN-1-7	0,2500	0,0100	0,2500	-	0,2230	-
Ps.aeruginosa AHN-1-8	-	-	0,0340	-	0,0450	-
Ps.aeruginosa AHN-1-10	-	-	0,0600	-	-	-
Ps. putida PpG7	0,0400	0,1360	0,0220	0,0680	-	-
Ps. putida NCIB9816	0,0180	0,2520	0,0720	0,1000	-	-

<sup>X</sup> K120 - катехол-1,2-диоксигеназа

<sup>XX</sup> K230 - катехол-2,3-диоксигеназа

- не изучалось

Этот первоначальный вывод требует дальнейшего более детального исследования.

У  $\text{NAH}^+$  бактерий были выявлены как катехол-1,2-, так и катехол-2,3-диоксигеназные активности. При этом выявились два интересных явления: во-первых, непигментированный быстрорастущий на нафталине штамм,  $\text{AHN-I-7}$  дал очень высокую катехол-1,2-диоксигеназную активность независимо от применяемого индуктора (табл. 6), и, во-вторых, у всех штаммов была выявлена низкая активность катехол-2,3-диоксигеназы. Надо подчеркнуть, что у быстрорастущих на нафталине штаммов активность катехол-2,3-диоксигеназы не превосходила уровня этого фермента медленно растущих штаммов. Эти данные показывают, что в  $\text{NAH}$ -плазидах регуляция экспрессии  $\text{Nah}^-$  и  $\text{Sal}^-$  оперонов происходит независимо от регуляции плазмидного оперона, определяющего разложение катехола. Сказанное подтверждают еще наши данные, согласно которым  $\text{NAH}^+\text{SAL}^-$  культуры имеют активность как катехол-1,2-, так и катехол-2,3-диоксигеназ.

Сравнивая вышеизложенные свойства  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  бактерий, можно сделать вывод, что у этих бактерий присутствуют  $\text{NAH}$ - и  $\text{SAL}$ -плазмиды, и  $\text{SAL}$ -плазмиды не являются делеционными мутантами  $\text{NAH}$ -плазмид, хотя все бактерии были выделены из одной почвенной пробы.

### Заключение

Из одной почвенной пробы изолированы штаммы псевдомонад, имеющие  $\text{NAH}$ - и  $\text{SAL}$ -плазмиды. По предварительным данным  $\text{SAL}$ -плазмиды определяют катаболизм салициловой кислоты через орто-путь и  $\text{NAH}$ -плазмиды через мета-путь расщепления катехола. Элиминанты  $\text{SAL}^+$  штаммов, неспособные расти на салициловой кислоте, одновременно потеряли способность расти на бензоате. У  $\text{NAH}^+$  штаммов происходила независимая элиминация  $\text{NAH}^+$  и  $\text{SAL}^+$  признаков. Выявлены медленно растущие на нафталине и на салициловой кислоте клоны, которые ревертируются обратно к быстрорастущему фенотипу.

### Л и т е р а т у р а

Боронин А.М., Борисоглебская А.Н., Старовойтов И.И. Мутанты плазмиды  $\text{NPL-I}$ , контролирующей окисление нафталина. - Докл. АН СССР, 1977б, т.235, с.494-496.

- Боронин А.М., Кочетков В.В., Старовойтов И.И., Скрябин Г.К. Плазмиды pBS2 и pBS3, контролирующие окисление нафталина у бактерий рода *Pseudomonas*. - Докл. АН СССР, 1977а, т.237, с.1205-1208.
- Боронин А.М., Старовойтов И.И., Борисоглебская А.Н., Скрябин Г.К. Плазида *Pseudomonas putida*, контролирующая первичные этапы окисления нафталина. - Докл. АН СССР, 1976, т.228, с.962-965.
- Кильк А.Х., Хейнару А.Л., Касак Л.А. Изучение индукции синтеза катехол-2,3-оксигеназы на уровне интактных клеток. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып.583. Экспрессия генетической информации и дифференцировка клеток. Труды по цитол. и генетике, 3, с.50-62.
- Кочетков В.В., Еремин А.А., Перебиток А.Н., Старовойтов И.И., Боронин А.М. Новая плазида биодegradации нафталина. - Плазмиды как векторные молекулы при передаче генет. информ. 4-е рабоч. совещ. по программе "Плазида", Тарту-Кяэрику, 1979. Тез. докл. Тарту, 1979, с.88-89.
- Скрябин Г.К., Старовойтов И.И. Альтернативный путь катаболизма нафталина *Pseudomonas fluorescens*. - Докл. АН СССР, 1975, т.221, с.493-495.
- Старовойтов И.И., Боронин А.М., Скрябин Г.К. Сравнительное изучение путей катаболизма нафталина у двух штаммов *Pseudomonas putida*. - Докл. АН СССР, 1976, т. 228, с. 228-231.
- Старовойтов И.И., Тимкина Е.О. pBS2 -плазида биодegradации, контролирующая синтез катехол-1,2-оксигеназы. - Докл. АН СССР, 1981, т.256, с.196-198.
- Хейнару А.Л., Домарадский И.В., Бородулина О.В. Местные штаммы псевдомонад, имеющие *TOL*-, *SAM*-, *OCT*-, *MAN*-, *SAL*- и *TFD*- плазмиды. - Плазмиды как векторные молекулы при передаче генет. информ. 4-е рабоч. совещ. по программе "Плазида", Тарту-Кяэрику, 1979. Тез. докл. Тарту, 1979, с.151-153.
- Chakrabarty, A.M. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. - J. Bacteriol., 1972, v. 112, p. 815 - 823.
- Davies, J.I., Evans, W.C. Oxidative metabolism of naphthalene by pseudomonads. - Biochem. J., 1964, v. 91, p. 251 - 261.

- Duggleby, C.J., Bayley, S.A., Worsey, M.J., Williams, P.A., Broda, P. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in Pseudomonas. - J. Bacteriol., 1977, v.130, p. 1274 - 1280.
- Dunn, N.W., Gunsalus, I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. - J. Bacteriol., 1973, v. 114, p. 974 - 979.
- Eckhardt, T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. - Plasmid, 1978, v. 1, p. 584 - 588.
- Farrell, R., Chakrabarty, A.M. Degradative plasmids: molecular nature and mode of evolution. - In: K.N. Timmis and A. Pühler (eds.). Plasmid of Medical, Environmental and Commercial Importance, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979, p. 97 - 109.
- Fennewald, M., Benson, S., Oppici, M., Shapiro, J. Insertion element analysis and mapping of the Pseudomonas plasmid alk regulon. - J. Bacteriol., 1979, v. 139, p. 940 - 952.
- Fennewald, M., Benson, S., Shapiro, H. Plasmid-chromosome interactions in the pseudomonas alkane system. - In: D. Schlessinger (ed.). Microbiology - 1978, Washington, D.C., 1978, p. 170 - 172.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Timmis, K.N. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from Pseudomonas putida and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7458 - 7462.
- Hansen, J.B., Olsen, R.H. Isolation of large bacterial plasmids: characterization of the P2 incompatibility group plasmids p<sub>MG1</sub> and p<sub>MG5</sub>. - J. Bacteriol., 1978, v. 135, p. 227 - 238.
- Murray, K., Duggleby, C.J., Sala-Trepat, J.M., Williams P.A. The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the metacleavage pathway by Pseudomonas arvilla mt-2. - Eur. J. Biochem., 1972, v. 28, p. 301 - 310.
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss III, R., Datta, N., Falkow, S. Uniform nomenclature of bacterial plasmids: a proposal. - Bacteriol. Rev., 1976, v.40, p. 168 - 189.

- Ornston, L.N. The conversion of catechol and protocatechuate to  $\beta$ -keto adipate by Pseudomonas putida. IV. Regulation. - J. Biol. Chem., 1966, v. 241, p. 3800 - 3810.
- Sala-Trepat, J.M., Evans, W.C. The meta cleavage of catechol by Azotobacter species. 4-Oxalocrotonate pathway. - Eur. J. Biochem., 1971, v. 20, p. 400 - 413.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Douçoroff, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. - J. Gen. Microbiol., 1966, v. 43, p. 159 - 273.
- Wheels, M.L. The genetics of dissimilatory pathways in Pseudomonas. - Ann. Rev. Microbiol., 1975, v. 29, p. 505 - 524.
- Williams, P.A., Worsey, M.J. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. J. Bacteriol., 1976, v. 125, p. 818 - 828.
- Zuniga, M.C., Durham, D.R., Welch, R.A. Plasmid and chromosome-mediated dissociation of naphthalene and salicylate in Pseudomonas putida PMD-1. - J. Bacteriol., 1981, v. 147., p. 836 - 843.

INSTABILITY OF DEGRADATIVE PLASMID-BORNE GENETICAL AND  
BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS IN PSEUDOMONADS METABOLIZING  
NAPHTHALENE AND SALICYLATE

L. Kasak, A. Heinaru

S u m m a r y

New types of NAH- and SAL-plasmids were studied and characterized in wild type strains of pseudomonads. According to the preliminary data salicylate is metabolized via ortho and naphthalene via meta pathway of catechol. The SAL-derivatives failed to grow on salicylate and benzoate. It was observed that the subclones that grew very slowly on salicylate and naphthalene produced revertants of original NAH<sup>+</sup> and SAL<sup>+</sup> phenotype.

НОВЫЙ ТИП ДЕГРАДАТИВНЫХ ПЛАЗМИД У  
*Alcaligenes paradoxus*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ У  
БАКТЕРИЙ СПОСОБНОСТЬ РОСТА НА АГАРОЗЕ

А.Хейнару, А.Мяз

Для выращивания микроорганизмов твердые питательные среды содержат полисахарид агар-агар, добываемый из морских водорослей. Основной компонент очищенного агара - агароза является полисахаридом, образующимся 3-О-связанной  $\beta$ -Д-галактопирунозы и 4-О-связанной 3,6-ангидро- $\beta$ -L-галактопирунозы (Young et al., 1978).

Агар применяется в питательных средах в качестве инертного соединения, образующего гель и не являющегося источником углерода для роста бактерий. С другой стороны, уже в начале настоящего столетия из морской воды были изолированы бактерии, способные разлагать агар (Gran, 1902). В этой же работе была описана простая методика, т.н. йодитный тест или тест Грана для выявления агар-разлагающихся бактерий. В настоящее время известны многие морские и некоторые почвенные бактерии, имеющие способность разлагать агар и агарозу (Patel, 1979, 1980).

Выяснено, что разложение агарозы происходит за счет микробных экзоферментов, получивших общее название "агаразы". Показано наличие нескольких разных типов агараз, в частности,  $\alpha$ -агаразы, атакующая (I  $\rightarrow$  3)  $\beta$ -L-связи с образованием агароолигосахаридов (Young et al., 1978) и  $\beta$ -агаразы, атакующая (I  $\rightarrow$  4)  $\beta$ -D-связи с образованием неоагароолигосахаридов (Sampietro, DeSampietro, 1971). Дальнейшее разложение олигосахаридов происходит за счет связанных с клетками ферментов олигосахаридаз, например, таких, как гидролазы  $\alpha$ -неоагаротетразы и  $\alpha$ -неоагаробioзы (Groleau, Yarbe, 1977). В результате этого образуются моносахариды Д-галактоза и 3,6-ангидро-L-галактоза, являющиеся хорошими субстратами для роста бактерий.

Хотя уже около 40 лет тому назад была отмечена спонтан-

ная элиминация микробов способности разлагать агар (Zobell, Allen, 1935; Zobell, Upham, 1944), причины этого явления до настоящего времени не выявлены (Patel, 1980). Следует еще отметить, что все исследователи обращали главное внимание на способность бактерий разлагать агарозы, а не на способность микробов расти на агарозе как на единственном источнике углерода и энергии.

Исходя из вышесказанного задачей настоящего исследования являлось выделение из природных источников бактерий, способных быстро расти на агаре и на агарозе как на единственном источнике углерода и энергии. Дополнительно были поставлены опыты для выяснения, является ли способность роста бактерий на агаре и агарозе и продукция внеклеточных агараз плазмидными признаками у бактерий.

#### Материал и методика

Штаммы бактерий. Генетическая характеристика и происхождение штаммов, использованных в работе, даны в таблице I.

Среды. В качестве полноценной среды использовали бульон Лурия (пептон "Дифко" - 10, дрожжевой экстракт "Дифко" - 5, NaCl - 5 г/л бидистиллированной воды). Твердые среды содержали 1,5% агара "Дифко" (США) или 0,7% агарозы ("Sigma", США). Минеральной средой являлась среда M9. Раствор солей приготовили отдельно, в 4 раза более концентрированно ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 28,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 12,0, NaCl - 2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 4 г/л бидистиллированной воды). Микроэлементы добавляли по ранее нами описанной методике (Кильк и др., 1982). Минимальные среды готовили, исходя из следующего расчета: 2%-ный водной агар или 1,0%-ная агароза - 300 мл, соли M9 - 100 мл, микроэлементы - 1,0 мл. Единственным источником углерода в этих средах являлись агар или агароза. Необходимые аминокислоты и азотистые основания вносили в среду в концентрации 20мкг/мл. Глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит, сахароза и галактоза добавлялись в среду в конечной концентрации 1%. Продукцию флуоресцирующих пигментов изучали в средах King A и King B (Stanier et al., 1966; King, Phillips, 1978). Среда для определения видовой принадлежности бактерий являлись стандартными (Stanier et al., 1966).

Лекарственные вещества. В работе применяли следующие

Таблица I

## Бактериальные штаммы, использованные в работе

№№ п/п	ВИД бактерий	Штамм	Генотип <sup>х</sup>	Источник полу- чения штамма
1.	<i>Ps. putida</i>	mt-2 PAW340	trp str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия)
2.	<i>Ps. putida</i>	AC10	met str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия) str <sup>r</sup> спонтанно, настоящая рабо- та
3.	<i>Ps. putida</i>	AC34	ade str <sup>r</sup>	П.Брода (Англия) str <sup>r</sup> спонтанно, настоящая рабо- та
4.	<i>Ps. aeruginosa</i>	PAO I670	ade leu rif <sup>r</sup>	П.Брода (Англия)
5.	<i>A. paradoxus</i>	AG1	прототроф, Aga1	настоящая рабо- та
6.	<i>A. paradoxus</i>	AG2	прототроф, Aga2	настоящая рабо- та
7.	<i>A. paradoxus</i>	AG3	прототроф, Aga3	настоящая рабо- та
8.	<i>A. paradoxus</i>	AG4	прототроф, Aga4	настоящая рабо- та
9.	<i>A. paradoxus</i>	AG5	прототроф, Aga5	настоящая рабо- та
10.	<i>A. paradoxus</i>	AG1-I	прототроф, aga, str <sup>r</sup>	настоящая рабо- та
11.	<i>A. paradoxus</i>	AG2-I	прототроф, aga, str <sup>r</sup>	настоящая рабо- та
12.	<i>A. paradoxus</i>	AG3-I	прототроф, aga, str <sup>r</sup>	настоящая рабо- та
13.	<i>A. paradoxus</i>	AG4-I	прототроф, aga, str <sup>r</sup>	настоящая рабо- та
14.	<i>A. paradoxus</i>	AG5-I	прототроф, aga, str <sup>r</sup>	настоящая рабо- та

<sup>х</sup>Обозначения соответствуют номенклатуре, принятой Новиком с соавторами (Novick et al., 1976); способность роста на агарозе (Aga1, Aga2, Aga3, Aga4, Aga5), отсутствие роста на агарозе (aga<sup>-</sup>).

лекарственные вещества: стрептомицин сульфат, рифампицин ("Serya", ФРГ), тетрациклин гидрохлорид, гентамицин сульфат и карпенициллин ("Beecham Research Laboratories", Англия).

Выращивание бактерий. Бактерии выращивали в термостате при 28°C. В некоторых опытах культивирование микробов проводили при 4°, 20°, 37° и 41°C.

Видовая принадлежность местных штаммов бактерий. Видовая принадлежность была определена по общепринятой методике (Stanier et al., 1966; Bergery's ..., 1974).

Изучение продукции внеклеточных агараз. Продукцию внеклеточных агараз определяли чашечным методом с раствором Лиголя (J<sub>2</sub> - 3,3, КЛ - 6,6 г/л воды) по общепринятой методике (Gran, 1902; Young et al., 1978).

Опыты по элиминации. В работе была изучена элиминация способности бактерий продуцировать внеклеточные агаразы и роста на агарозе как на единственном источнике углерода. Элиминация названных признаков изучалась после пассажей бактериальных культур в L-среде по общепринятой методике (Williams, Worsey, 1976).

Опыты по конъюгации. Трансмиссивность способности роста на агаре и на агарозе изучали чашечным методом на поверхности питательной среды (Williams, Worsey, 1976). Штаммами-реципиентами служили три штамма *Pseudomonas putida* (PaW340, AC10, AC34), штамм *Ps. aeruginosa* PAO I670 и пять штаммов местных бактерий, утративших способность расти на агарозе (табл. I). Для селекции трансконъюгантов были использованы различия штаммов доноров и реципиентов в резистентности к стрептомицину (1000 мкг/мл) или рифампицину (100 мкг/мл) и по способности роста на агарозе. Потенциальные рекомбинантные клоны очищали на селективных средах того же состава, после чего определяли наличие неселективных маркеров донора и реципиента.

Выделение плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли по методике Хансена и Ольсена (Hansen, Olsen, 1978). Препараты плазмидной ДНК очищали в градиенте CsCl на центрифуге Beckman L8-70, вертикальный ротор T145. Этидий бромистый удаляли изопропанолом и CsCl диализом против TES-буфера (0,05 M Трис-НСI, 0,005 M ЭДТА, 0,05 M NaCl, pH 8,0).

Гель-электрофорез. Наличие плазмидной ДНК определяли электрофоретически в 0,7%-ном агарозном геле (Duggleby et al., 1977).

Электронная микроскопия. Наличие жгутиков бактерий изучалось по общепринятой методике (Davis et al., 1971).

### Результаты и обсуждение

В работе была поставлена задача выделить природные штаммы бактерий, способных к быстрому размножению на средах с агарозой как на единственном источнике углерода и энергии.

Вначале почвенные пробы были взяты из ботанического сада Тартуского государственного университета и на территории лесопромышленной фабрики в г. Тарту. Водяные пробы были взяты из залива Сеалахт в Балтийском море вблизи острова Сааремаа и из пруда в ботаническом саду г. Тарту. В накопительных культурах с 0,1%-ной агарозой удалось выделить ряд микробов, способных разлагать агарозу, продуцировать агаразу и расти на агарозе. Все эти микробы характеризовались как медленнорастущие на агарозе бактерии и дальнейшему изучению не подвергались.

Успех при выделении агарозо-разлагающих быстрорастущих на агарозе бактерий был достигнут, когда нами была применена в качестве источника микробов и агара масса частично высушенных водорослей из рода *Gracillaria* sp., полученных из Черного моря. В ходе очистки культур был получен ряд штаммов бактерий, давший при 48-часовой инкубации при 28°C на средах с агарозой как на единственном источнике углерода большие слизистые колонии. В данной работе представлены данные по изучению пяти выделенных нами штаммов бактерий.

Видовая принадлежность изучаемых штаммов бактерий. Все пять штаммов бактерий продуцировали внеклеточные агаразы, являлись неподвижными, грамтрицательными палочковидными бактериями, прототрофами, разлагали желатин, не росли на высоких концентрациях натрия хлора, росли при 4°, 20°, 28°, 37°C, не росли при 41°C, являлись строгими аэробами, оксидазоположительными, имели способность к денитрификации, не продуцировали флуоресцирующие пигменты в средах King A и King B и имели редуцированные жгутики по данным электронно-микроскопических исследований (табл. 2). Изучаемые штаммы бакте-

рий не продуцировали индол и  $H_2S$ , давали негативную реакцию Вогес-Проскауэра, имели оксидативный тип метаболизма, не образовывали газа при росте на разных сахарах, хотя по способности продукции газа выявлены незначительные различия (табл. 2). Изучаемые бактерии имели способность коагулировать лакмусное молоко с образованием кислоты. По нашим предварительным данным, все 5 изучаемых штаммов бактерий принадлежат к виду *Alcaligenes paradoxus*.

Одним из самых характерных свойств изучаемых штаммов бактерий было постоянное выщепление разных по морфологии колоний (белые, желтые, коричневые и секториальные) при росте бактерий на L-среде. Тип пигментации колоний не коррелировался с биохимическими признаками штаммов бактерий, продукцией агараз и способностью роста на агарозе. Все же пигментированные колонии давали более медленную положительную реакцию в оксидажном тесте. Выяснение причин вариабельности и морфологии колоний изучаемых бактерий требует специального исследования.

Стабильность признака "рост на агарозе". При росте штаммов *A. paradoxus* в неселективной среде элиминация признака способности роста на агарозе происходит с высокой частотой. В опытах по элиминации в L-среде в среднем 60% клонов потеряли способность роста на агарозе. Остальные же колонии разделялись на два - быстро- и медленно растущие на агарозе. Медленно растущие колонии давали узкую зону разложения агара вокруг колоний бактерий. У быстрорастущих колоний зона разложения агарозы вокруг колоний была широкая. У изученных штаммов бактерий частота элиминации способности роста на агарозе и признака продукции внеклеточных агараз являлась неидентичной (табл. 3).

Корреляции между окраской колоний и продукцией агаразы нам выявить не удалось, хотя была отмечена тенденция - желтые и коричневые колонии не продуцировали, в основном, агаразы (табл. 3).

Высокая частота элиминации способности роста на агарозе и продукции внеклеточных агараз позволила нам предположить плазмидную обусловленность названных признаков.

Передача способности роста на агарозе в процессе конъюгации. В опытах по конъюгации оказался неприменимым метод скрещивания бактерий в жидкой среде в связи с высокой нестабильностью изучаемого признака (рост на агарозе).

AG1	AG2	AG3	AG4	AG5	Штаммы бактерий	
					+	+
+	+	+	+	+	+	Рост на агарозе
+	+	+	+	+	+	Продукция агараз
-	-	-	-	-	-	Подвижность
-	-	-	-	-	-	Окрашивание по Граму
-	-	-	-	-	-	Питательные потребности
+/	+	+	+	+/	+	Желатиновый тест
-	-	-	-	-	-	7,5
-	-	-	-	-	-	12,0
+	+	+	+	+	+	Рост при концентрации NaCl (%)
-	-	-	-	-	-	4°, 28°, 37°
-	-	-	-	-	-	41°
-	-	-	-	-	-	Рост при (°C)
-	-	-	-	-	-	Рост в анаэробных условиях
+	+	+	+	+	+	Оксидазный тест
+	+	+	+	+	+	Денитрификация
-	-	-	-	-	-	Флуоресцирующие пигменты
+	+	+	+	+	+	Наличие редуцированных азотистых соединений
-	-	-	-	-	-	Продукция индола
-	-	-	-	-	-	Продукция H <sub>2</sub> S
-	-	-	-	-	-	Реакция Вогес-Проскауэра
+	+	+	+	+	+	Глюкозе
+	+	+	+	+	+	мальтозе
+	+	+	+	+	+	лактозе
+	+	+	+	+	+	манните
+	+	+	+	+	+	сахарозе
+	+	+	+	+	+	галактозе
+	+	+	+	+	+	Рост на
+	+	+	+	+	+	Тест с лакмусным молоком

Примечания: "+" - способность или положительная реакция  
 "-" - способность или отрицательная реакция  
 "+/-" - слабая реакция  
 "x" - образование кислот

Таблица 3

Элиминация способности роста бактерий *Alcaligenes paradoxus* на агарозе после пассажей культур в L-среде

Штаммы бактерий	Число изученных колоний	Число разнотипных колоний, способных (+) или неспособных (-) расти на агарозе												Продукция агаразы									
		Коричневые			Желтые			Секториальные			Белые												
		++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-										
AG1 Aga 1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	5	53	I4		
AG2 Aga 2	100	2	0	0	0	I	96	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	I*	
AG3 Aga 3	49	0	0	0	0	0	8	22	I	I8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	
AG4 Aga 4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	90	3	
AG5 Aga 5	100	0	0	7	0	0	I3	I	0	6	I	I	7I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
ACIO met str <sup>r</sup> Aga 3	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	4I	0	0
AG5 str <sup>r</sup> Aga 3	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	22	0	0

\* Секториальная колония

При скрещивании бактерий на поверхности питательной среды в чашках Петри удалось показать передачу способности роста на агарозе у четырех донорных штаммов *Alcaligenes paradoxus* (табл. 4). Донорный штамм *A. paradoxus* AG2 не передавал реципиентам способность роста на агарозе. Частично это можно объяснить тем, что даже на L-среде этот штамм имеет более медленный рост по сравнению с другими четырьмя штаммами *A. paradoxus*. Остальные четыре штамма группировались на два. Штаммы *A. paradoxus* AG3 и AG5 передавали способность на агарозе к элиминантным штаммам *A. paradoxus*, а штаммы AG1 и AG4 только к элиминанту *A. paradoxus* AG5-I  $aga^{-}str^{r}$  и штаммам *Pseudomonas putida* PaW340, AC10 и AC34 (табл. 4). В наших опытах передача способности роста на агарозе на штамм *Ps. aeruginosa* PAO I670 не была отмечена.

Полученные трансконъюганты дали только медленно растущие колонии на агарозе, которые, по данным калий-йодитного теста, дали узкие зоны разложения агарозы вокруг колоний. Из полученных трансконъюгантов два - *Ps. putida* AC10  $Aga4\ str^{r}$  и *A. paradoxus* AG5-I  $aga^{-}str^{r}\ Aga4$  были изучены в качестве донорных культур в скрещиваниях с девятью реципиентными культурами. В обоих случаях была выявлена передача способности роста на агарозе на реципиентные штаммы *A. paradoxus* AG3-I, AG4-I и AG5-I (табл. 4). Передачи изучаемого признака штаммам *Ps. putida* не были выявлены, несмотря на то, что с первоначальным штаммом *A. paradoxus* AG4 были получены положительные результаты.

Дополнительно у трансконъюгантов *Ps. putida* AC10  $Aga4$  и *A. paradoxus* AG5-I  $aga^{-}Aga4$  была изучена частота элиминации способности роста на агарозе (табл. 3). Эти трансконъюганты имели белый свет колоний и, как первоначальный штамм *A. paradoxus* AG4, дали с высокой частотой колонии, неспособные расти на агарозе при предварительном выращивании культур в L-среде.

Итак, все данные подтверждают, что способность роста на агарозе имеет плазмидную природу, причем этот признак передается в процессе конъюгации к реципиентным штаммам бактерий. Трансконъюганты способны продуцировать лишь в небольших количествах внеклеточные агаразы. Можно предположить, что в трансконъюгантах происходит неполная экспрессия плазмидных генов.

Таблица 4

Передача в процессе конъюгации способности роста на агарозе разным штаммам реципиентам

Штаммы реципиенты	Штаммы доноры	Местные штаммы <i>A. para-</i> <i>doxus</i>					Рекombинантные штаммы		
	AG1, AG2 Aga1	AG3 Aga2	AG4 Aga3	AG5 Aga4	AG5 Aga5	AC10 Aga4	AG5-I Aga4	aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	
AG1 aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	-	-	+	-	-	-	-	-	
AG2 aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
AG3 aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	-	-	++	-	+	++	++	++	
AG4 aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	-	-	++	++	+	++	++	++	
AG5 aga <sup>-</sup> str <sup>R</sup>	+	-	++	++	+	++	++	+	
PAO I670 ade <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> rif <sup>R</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
PaW340 trp str <sup>R</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	
AC34 ade str <sup>R</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	
AC10 met str <sup>R</sup>	++	-	-	+	-	NT	-	-	

"++" - передача способности роста на агарозе

"+" - передача способности роста на агарозе (отдельные трансконъюганты)

"-" - отсутствие передачи способности роста на агарозе

NT - не изучалось

Таблица 5

Резистентность к лекарственным веществам у штаммов *Alcaligenes faecalis*, их агаронегативных вариантов и у трансконъюгантов

Штаммы бактерий	Резистентность в мкг/мл к														
	тетрациклин				канамицин				карпенициллин			гентамицину			
	6	12,5	25	50	12,5	25	50	100	250	500	1000	5	10	20	50
AG1 Aga 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG2 Aga 2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG3 Aga 3	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG4 Aga 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG5 Aga 5	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG1-1 aga	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+
AG2-1 aga	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+
AG3-1 aga	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
AG4-1 aga	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
AG5-1 aga	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
AG5-1 aga Aga 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AG1-1 aga Aga 3	-	-	-	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+
AG3-1 aga Aga 3	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
AG4-1 aga Aga 3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG5-1 aga Aga 3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG3-1 aga Aga 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG4-1 aga Aga 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG5-1 aga Aga 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paw340 Aga 4	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+
AC10 Aga 4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
AG3-1 aga Aga 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG4-1 aga Aga 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG5-1 aga Aga 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AC10	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
Paw340	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-

"+" - резистентность к лекарственным веществам

"-/-" - чувствительность к лекарственным веществам

Копередача маркеров резистентности к лекарственным веществам. Изучаемые 5 штаммов *A. paradoxus* являлись чувствительными к тетрациклину и резистентными к канамицину, карпенициллину и гентамицину (табл. 5). Элиминанты, неспособные расти на агарозе и непродуцирующие агаразу, показали элиминации некоторых маркеров резистентности к лекарственным веществам. Так, штаммы *A. paradoxus* AG1-I  $aga^-$  и AG2-I  $aga^-$  стали чувствительными к карпенициллину, а штаммы *A. paradoxus* AG3-I  $aga^-$ , AG4-I  $aga^-$  и AG5-I  $aga^-$  - к канамицину и гентамицину (табл. 5). Эти данные дают основание предполагать, что соответствующие маркеры резистентности могут иметь плазмидную природу. Для доказательства этого предположения была изучена резистентность к лекарственным веществам у трансконъюгантов, полученных при передаче признака способности роста на агарозе. Полученные результаты подтверждали копередачу маркеров резистентности к карпенициллину или канамицину и гентамицину со способностью роста на агарозе. При этом штаммы AG3, AG4 и AG5 передают резистентность к канамицину и гентамицину, а штамм AG1 к карпенициллину вместе со способностью роста на агарозе (табл. 5).

Выделение плазмидной ДНК. Наличие плазмидной ДНК изучалось у штаммов *A. paradoxus* AG4  $Aga^4$ , у элиминанта AG4-1  $aga^-$  и у трансконъюганта *Ps. putida* Pw340  $Aga^4$ . Попытки же выделить высокоочищенную плазмидную ДНК из изученных штаммов *A. paradoxus* были связаны с трудностями при лизировании культур. Тем не менее нам удалось показать, что у первоначального штамма *A. paradoxus* AG4  $Aga^4$  и у трансконъюганта Pw340  $Aga^4$  выявляется на агарозном гель-электрофореze одинаковая по подвижности плазмидная ДНК. В контрольных опытах плазмидная ДНК отсутствовала у элиминанта *A. paradoxus* AG4-I  $aga^-$  и у реципиента *Ps. putida* Pw340.

В настоящее время нет данных о плаزمидях, определяющих разложение полимерных соединений. Известны все-таки плазмиды биодegradации, определяющие разложение основных мономерных компонентов полимерных соединений. Сюда относятся плазмиды, детерминирующие разложение компонентов лигнина (*Salikinoja-Salonen et al.*, 1979) и 4-метилфталата, главного компонента нейлона (*Anderson, Ribbons*, 1980). Выявленные в данной работе т.н. агаразные плазмиды определяют разложение агарозы с помощью ферментов агараз. Эти плазмиды, сообщающие бактериям информацию для биодеструкции агарозы, являются

первыми плазмидами, участвующими в процессе разложения полимерных соединений. Интересно отметить, что, по нашим данным, агарозные плазмиды содержат дополнительно гены резистентности к карпенициллину или канамицину и гентамицину. В литературе имеется пока одно сообщение, где в составе тог-плазмиды имеются гены резистентности к стрептомицину и сульфонамидам (Yano, Nishi, 1980).

### Заключение

Из материала частично высушенных водорослей *Gracillaria* sp. удалось выделить штаммы бактерий *Alcaligenes paradoxus*, способных к быстрому росту на агаре и на агарозе как на единственном источнике углерода. При предварительном культивировании бактерий в неселективной среде частота элиминации способности бактерий продуцировать внеклеточные агаразы составляет более 50%. В опытах по конъюгации была доказана способность бактерий передавать признак роста на агаре к реципиентным культурам бактерий совместно с передачей способности продукции внеклеточных агараз. Совместно с передачей способности роста на агарозе передавалась резистентность к карпенициллину или канамицину и гентамицину. Из первоначальных культур и из трансконъюгантов была выделена плазмидная ДНК. Сделан вывод о наличии нового типа плазмиды биодеградации у штаммов *A. paradoxus*, определяющих у бактерий способность роста на агаре и на агарозе как на единственном источнике углерода и энергии.

### Л и т е р а т у р а

- Кильк А.Х., Хейнару А.Л., Касак Л.А. Изучение индукции синтеза катехол-2,3-оксигеназы на уровне интактных клеток. - Учен. зап. ТГУ, 1982, вып. 583. Экспрессия генетической информации и дифференцировка клеток. Труды по цитол. и генетике, 3, с. 50-62.
- Anderson, B.N., Ribbons, D.W. 4-methylphthalate utilization plasmid encoded functions in soil pseudomonads. - Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 1980, 137.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.

- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
- Davis, R.W., Simon, M., Davidson, M. Electron microscope heteroduplex methods mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. - *Methods Enzymol.*, 1971, v. 21, p. 413 - 428.
- Duggleby, C.J., Bayley, S.A., Worsey, M.J., Williams, P.A., Broda, P. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in Pseudomonas. - *J. Bacteriol.*, 1977, v. 130, p. 1274 - 1280.
- Gran, H.H. Studien über Meeresbakterien. II. Ueber die Hydrolyse des Agars durch ein neues Enzyme, die Gelase. - *Bergens Museum Aaborg*, 1902, v. 2, p. 1 - 16.
- Groleau, D., Yaphe, W. Quantitative thin-layer chromatographic assay for the  $\beta$ -necagarotetrose hydrolase of Pseudomonas atlantica. - *J. Chromatogr.*, 1977, v. 137, p. 234 - 239.
- Hansen, J.B., Olsen, R.H. Isolation of large bacterial plasmids: characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. - *J. Bacteriol.*, 1978, v. 135, p. 227 - 238.
- King, A., Phillips, I. The identification of Pseudomonas and related bacteria in a clinical laboratory. - *J. Med. Microbiol.*, 1978, v. 11, p. 165 - 176.
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss III, R., Datta, N., Falkow, S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. - *Bacteriol. Rev.*, 1976, v. 40, p. 166 - 189.
- Patel, K.S. A new record of agar-digesting microflora. - *Geobios*, 1979, v. 6, p. 266.
- Patel, K.S. Agar and alignate digesting microflora from marine substrata of India. *Geobios*, 1980, v. 7, p. 3-8.
- Salkinoja-Salonen, M.S., Väisänen, E., Paterson, A. Involvement of plasmids in the bacterial degradation of lignin-derived compounds. - In K. N. Timmis and A. Pühler (eds.). *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979, 97-1 p. 301 - 314.
- Sampietro, A.R., DeSampietro, M.A.V. Characterization of the agarolytic system of Agrobacterium pastinator. - *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, v. 244, p. 207 - 212.

- Stanier, R.Y., Palleroni, N., Douderoff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. - J. Gen. Microbiol., 1966, v. 43, p. 159 - 271.
- Williams, P.A., Worsey, M.J. Ubiquity of plasmids encoding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. - J. Bacteriol., 1976, v. 125, p. 818 - 828.
- Yano, K., Nishi, T. pKW1, a naturally occurring conjugative plasmid coding for toluene degradation and resistance to streptomycin and sulfonamides. - J. Bacteriol., 1980, v. 143, p. 552 - 560.
- Young, K.S., Bhattacharjee, S.S., Yaphe, W. Enzymatic cleavage of the  $\alpha$ -linkage in agarose to yield agarooligosaccharides. - Carbohydrate Res., 1978, v. 66, p. 207 - 212.
- ZoBell, C.E., Allen, E.C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. - J. Bacteriol., 1935, v. 29, p. 239 - 251.
- ZoBell, C.E., Upham, H.C. A list of marine bacteria including description of sixty new species. - Bull. Scripps Inst. Oceanogr., 1944, v. 5, p. 239 - 292.

A NEW TYPE OF DEGRADATIVE PLASMIDS IN STRAINS OF  
ALCALIGENES PARADOXUS ENCODING THE ABILITY OF BACTERIA  
TO GROW ON AGAROSE

A.L. Heinaru, A.A. Mäe

S u m m a r y

The strains of Alcaligenes paradoxus able to grow on agar and on agarose as the only carbon source were isolated in enrichment cultures. These strains produce extra-cellular agarases. In mating experiments the agarose-growth phenotype together with the ability of bacteria to produce extra-cellular agarases was transferable to new recipient cells. Besides, the resistance to carpenicillin or to kanamycin and gentamycin was co-transferable with the ability of bacteria to grow on agarose. The wild type bacteria as well as the transconjugants contained plasmid DNA. Those results suggest that the strains of Alcaligenes paradoxus contained a new type of degradative plasmids encoding the production of extra-cellular agarases and the ability of bacteria to grow on agarose as the only carbon source.

УДК 582.282.23.095:577.158

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТАНОЛА НА СКОРОСТЬ ЕГО  
УСВОЕНИЯ И ДЫХАНИЯ У МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩИХ ДРОЖЕЙ  
*Candida boidinii*. Симискер Я., Хейнару Э. и  
Ныгес Т. Учен. зап. Тартуск. гос.ун-та, вып.624.  
Труды по микробиологии III. Регуляция метабо-  
лизма энергетического субстрата у микрооргани-  
зов. Тарту, 1982, с. 5-20.

У метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* исследо-  
вано влияние концентрации метанола на скорость его усвоения  
и дыхания у клеток из различных стадий развития культур. Мак-  
симальная скорость дыхания достигается при несколько более  
высоких концентрациях метанола (около 1 - 2 мМ), чем макси-  
мальная скорость его усвоения (около 0,7 - 1 мМ). Окисление  
метанола сопряжено с максимальной эффективностью усвоения  
метанола только в узком интервале концентрации субстрата, от-  
вечающего на кривых зависимости  $V$  от  $[S]$  ассимиляции пе-  
регибу кривых на плато. Предполагается, что скорость усвое-  
ния метанола в зависимости от стадии развития культур опре-  
деляется либо алкогольоксидазой, либо каким-то регуляторным  
ферментом усвоения формальдегида, обладающим аллостеричес-  
кими свойствами.

Рис. - 7. Библ. - 21 назв. .

УДК 582.282.23.095:577.158

**ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ, ДЫХАНИЯ И СКОРОСТИ УСВОЕНИЯ МЕТАНОЛА В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ ДРОЖЖЕЙ.** Р. Кыйвээр, Н. Пеэт, Я. Симискер. Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып. 624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 21-35.

У дрожжей *Candida boiðinii* исследована динамика активности алкогольоксидазы (АО) в синхронно- и асинхронно растущих культурах. В синхронно растущих культурах при переходе клеток к почкованию и в периодических культурах в лаг-фазе обнаружена быстрая инактивация АО. Ингибиторы транскрипции (этидиумбромид) и трансляции (циклогексимид) подавляют инактивацию АО. Предполагается, что инактивации АО предшествует синтез белкового фактора инактивации. Прямой связи между инактивацией АО и накоплением формальдегида в среде не обнаружено. Клетки с различной активностью АО, полученные путем фракционирования клеток в градиенте сахарозы, обладают различной скоростью дыхания и скоростью усвоения метанола. Максимальная скорость усвоения метанола и дыхания обнаруживается у клеток максимальной активности АО. Инактивация АО в клетках сопровождается уменьшением скорости и эффективности усвоения метанола.

Рис. - 6, табл. - 2, библиогр. - 10 назв.

УДК 582.282.23.095:546.261

ПУТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТАНОЛА У ДРОЖЖЕЙ *Pichia pinus*. Кахру А., Аламяе Т. Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып. 624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 36-47.

Исследовано влияние различных источников углерода (глюкоза и метанол) на образование ферментов энергетического использования субстрата у дрожжей *Pichia pinus*. Показано, что при росте дрожжей на среде с метанолом в клетках дрожжей имеются активности как ферментов первичного окисления метанола, так и цитратного цикла. По данным энзимологического и ингибиторного анализов сделан вывод, что энергетическое использование метанола связано в основном с его окислением через формальдегид и формиат. Функционирование цитратного цикла направлено к биосинтезу аминокислот и других продуктов промежуточного обмена, но не исключена и энергетическая функция.

Рис. - 1. Табл. - 1. Библ. - 24 назв.

УДК 582.282.23.095:577.158

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА У *Pichia pinus*. Аламяэ Т., Тэугяс Х. Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып.624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 48-59.

Исследовано образование ферментов метаболизма метанола при росте дрожжей на различных источниках углерода и на их смесях с метанолом. Наиболее сильными репрессорами синтеза ферментов метаболизма метанола являются глюкоза и ксилоза. Ингибирующий эффект глицерола и сукцината меньше и в присутствии этих субстратов синтез исследуемых ферментов частично активируется. Предполагается, что в регуляции синтеза ферментов метаболизма метанола участвуют как механизмы репрессии, так и индукции.

Рис. - 9. Библ. - 18 назв.

УДК 582.282.23.095:577.158

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАНОЛА ПРИ ПОМОЩИ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ.**

Тэугяс Х., Кангур Р. Учен. зап. Тартуск.гос. ун-та, вып.624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата и микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 60-66.

Представлен энзимологический метод определения метанола при помощи очищенного препарата алкогольоксидазы. Алкогольоксидаза была выделена из метанолусваивающих дрожжей *Candida boidinii* и очищена хроматографией бесклеточного экстракта на ДЭАЭ - целлюлозе. Представлена схема серийного анализа для определения метанола при помощи очищенного препарата дрожжевой алкогольоксидазы.

Рис. - 3. Библ. - 9 назв.

УДК 576.807.8

**ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СУБСТРАТА У ДЕНИТРИФИКАТОРОВ.**

Хенно И., Кухлберг Л., Таллсеп Э. Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып. 624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 67-79.

Исследовано влияние различных источников углерода (глюкоза, сукцинат и цитрат) и конечных акцепторов электронов ( $O_2$  и  $NO_3^-$ ) на образование ферментов цитратного цикла у двух денитрифицирующих бактерий. Показано, что у *Bacterium agile* var. *hartlebii* образование ферментов цитратного цикла подвергается катаболитной репрессии глюкозой. У *Pseudomonas denitrificans* уровень ферментов цитратного цикла в клетках не зависит от источника углерода, и их образование носит конститутивный характер. Промежуточные продукты цитратного цикла - сукцинат и цитрат у *Parasoccus denitrificans* подавляют синтез ферментов катаболизма глюкозы. Предполагается, что индуцируемый или конститутивный характер образования ферментов цитратного цикла зависит от типа путей катаболизма глюкозы.

Табл. - 5. Библ. - 14 назв.

УДК 575.1.113 + 576.851.1.

Касак Л.А., Хейнару А.Л. Генетическая и биохимическая нестабильность штаммов бактерий с плазмидами биодеградации, контролирующих окисление нафталина и салициловой кислоты. - Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып. 624. Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 80-95.

В работе описаны новые NAN- и SAL-плазмиды у штаммов псевдомонад, изолированных из одной почвенной пробы. Показано, что SAL-плазмиды определяют катаболизм салициловой кислоты через орто-путь и NAN-плазмиды - через мета-путь расщепления катехола. Из SAL<sup>+</sup> штаммов получены элиминанты, неспособные расти на салициловой кислоте и на бензоате. Выявлена реверсия медленно растущих на салициловой кислоте и на нафталине клонов обратно к быстрорастущему фенотипу.

Табл. 6, рис. -, библи. 27 назв.

УДК 575.1.113 + 576.851.1

НОВЫЙ ТИП ДЕГРАДАТИВНЫХ ПЛАЗМИД У *Alcaligenes paradoxus*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ У БАКТЕРИЙ СПОСОБНОСТЬ РОСТА НА АГАРОЗЕ. Хейнару А.Л., Мяз А.А. - Учен. зап. Тартуск. гос. ун-та, вып. 624 . Труды по микробиологии III. Регуляция метаболизма энергетического субстрата у микроорганизмов. Тарту, 1982, с. 96-III.

Из материала частично высушенных водорослей *Gracillaria* sp. выделены штаммы бактерий *Alcaligenes paradoxus*, способных к быстрому росту на агаре и на агарозе как на единственном источнике углерода и энергии. На основе опытов по элиминации, конъюгации и выделению плазмидной ДНК доказано наличие плазмид биodeградации, определяющее способность бактерий расти на агаре и на агарозе, и продукции внеклеточных агараз. В этих трансмиссивных плазмидах присутствуют гены резистентности к карпенициллину или канамицину и гентамицину.

Табл. 5, рис. -, библ. 20 назв.