

ОБ АМИНОАЦИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.А. ЭЛИАЗЯН, А.Х. ПАРОНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Выявлено наличие аминоксилазной активности у некоторых видов фототрофных бактерий. Подобраны оптимальные условия для биосинтеза фермента. Изучены методические подходы для повышения ацилазной активности.

Ֆոտոտրոֆ բակտերիաների մի քանի տեսակների մոտ հայտնաբերվել է ամինաացիլազային ակտիվություն: Ընտրվել են ֆերմենտի կենսասինթեզի օպտիմալ պայմանները: Ուսումնասիրվել են ացիլազային ակտիվության բարձրացման մեթոդական մոտեցումները:

The presence of the aminoacylase activity of photosynthetic bacteria was revealed. The optimal growth conditions of bacteria for enzymatic activity and methodical approaches for its increase have been investigated.

Фототрофные бактерии - аминокислоты - ацилазная активность

Одним из перспективных путей получения оптически чистых аминокислот является ферментативный метод расщепления химических рацематов аминокислот с применением микробных ацилаз. Исследования микробных аминоксилаз проводятся в целях поиска более активных продуцентов и определения характеристики ацилазной системы для выяснения ее биологического значения и возможностей направленного регулирования.

Аминоксилазы широко представлены у различных систематических групп микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей [3, 6-8]. Исследования аминоксилаз у различных групп микроорганизмов показали, что они различаются по своим физико-химическим свойствам, что оказывает определенное влияние на выход фермента и его активность [1, 2, 6]. В этом аспекте в литературе нет сведений о представителях фототрофных бактерий. Между тем фотосинтезирующие бактерии представляют большой интерес как источник получения биомассы, богатой белком, витаминами и аминокислотами [5]. Среди них описаны многочисленные штаммы с высокой гидрогеназной, каталазной, нитрогеназной и другой ферментативной активностью [4, 9, 10].

Наша задача заключалась в выяснении наличия ацилазной системы у фотосинтезирующих пурпурных бактерий и изучении особенностей регуляции биосинтеза фермента у культур, обладающих выраженной ацилазной активностью.

Материал и методика. Объектом исследований были несерные пурпурные бактерии: *Rhodospirillum rubrum* (1 шт.), *Rhodobacter capsulatus* (3 шт.), *Rh.sulfidophilus* (1 шт.), *Rh.sphaeroides*

(4 шт.), *Rhodopseudomonas viridis* (1 шт.), *Rh. palustris* (3 шт.), всего 13 культур из коллекций МГУ и Института микробиологии НАН Армении.

Культуры выращивали на среде Ормеруда в течение 2-3 суток при анаэробных условиях в люминестате при освещении 2000 люкс и 30°. Собранные центрифугированием клетки трижды промывали охлажденным 0,1М фосфатным буфером и ресуспендировали в том же буфере. Реакционная смесь состояла из 1 мл клеточной суспензии, содержащей 20-30 мг в пересчете на сухой вес биомассы и 1 мл 0,2 М раствора субстрата, pH 7-8. Смесь инкубировали при 37° в течение часа. L-аминокислоты определяли методом хроматографии в тонком слое целлюлозы или на бумаге. Удельную аминокислотную активность выражали в мкМ/час/100 мг абсолютно сухой биомассы (6-7). В качестве субстратов применяли чистые препараты ацетил-производных рацематов аланина, метионина, серина, триптофана и фенилаланина.

Результаты и обсуждение. Установлено, что большинство изученных штаммов фототрофных бактерий проявляют ацилазную активность в отношении нескольких ацил-производных аминокислот, т.е. обладают широким спектром субстратной специфичности. Некоторые из изученных микроорганизмов обладали слабой активностью (табл. 1).

Таблица 1. Ацилазная активность фототрофных бактерий
(мкМ аминокислоты/100 мг абсолютно сухой биомассы/час)

Штаммы	Ацетил DL -				
	метионин	аланин	серин	фенилаланин	триптофан
<i>Rh. capsulatus</i>	120,7	130,2	53,5	130,2	2,9
<i>Rh. capsulatus</i> B10	98,0	68,5	31,8	73,8	3,5
<i>Rh. capsulatus</i> lowis	87,5	110,0	28,7	122,4	5,6
<i>Rh. palustris</i> -1	126,3	92,7	84,3	108,9	10,3
<i>Rh. palustris</i>	97,8	83,6	65,6	73,9	8,7
<i>Rh. palustris</i> Ф-255	90,0	49,9	90,1	63,8	11,2
<i>Rh. sphaeroides</i> 59/3	57,6	63,8	23,6	102,8	13,5
<i>Rh. sphaeroides</i>	55,2	58,6	18,2	87,6	9,5
<i>Rh. sphaeroides</i> 8259	48,9	36,5	7,5	59,7	3,4
<i>Rh. sphaeroides</i> Am	70,5	41,0	14,3	60,0	8,5
<i>Rh. viridis</i>	45,4	68,7	11,5	121,3	9,3
<i>Rh. sulfidophilus</i>	41,2	32,7	12,2	110,4	4,8
<i>Rh. rubrum</i>	38,8	118,7	33,4	90,0	3,7

Для выявления оптимальных условий биосинтеза ацилаз и особенностей регуляции активности фермента у фототрофных бактерий были отобраны *Rh. capsulatus* и *Rh. palustris*-1, которые отличались выраженной ацилазной активностью. Как видно из табл. 2, на ацилазную активность благоприятно

Таблица 2. Влияние питательной среды на рост и ацилазную активность
(мкМ аминокислоты/100 мг абс. с. б./час)

Добавки к питательной среде, 1%	<i>Rh. capsulatus</i>		<i>Rh. palustris</i> -1	
	рост, ОП	аланин	рост, ОП	метионин
Пептон	0,51	148,2	0,47	156,0
Дрожжевой экстракт	0,48	152,7	0,40	149,9
Кукурузный экстракт	0,35	80,1	0,28	101,2
Контроль	0,30	115,2	0,23	121,3

действует наличие в питательной среде пептона или дрожжевого экстракта. В этом случае одновременно повышается выход биомассы.

Изучалось влияние ацилпроизводных аминокислот в качестве индукторов на ацилазную активность. Выявлено, что при наличии ацилпроизводных аминокислот продуцирование фермента не происходит (табл. 3).

Таблица 3. Влияние ацилпроизводных аминокислот на рост и ацилазную активность

Штаммы	Субстрат 0,01%	Без субстрата		С субстратом	
		рост, ОП	мкМ/100 мг абс.с.б.	рост, ОП	мкМ/100 мг абс.с.б.
<i>Rh. capsulatus</i>	ацетил DL-аланин	0,35	122,0	0,25	120,1
<i>Rh. palustris</i>	ацетил DL-метионин	0,30	125,3	0,26	122,7

Известно, что присутствие в среде некоторых ионов металлов, особенно кобальта, в большинстве случаев стимулирует ферментативную активность микроорганизмов. Как видно из табл. 4, активность ацилаз значительно повышается в присутствии ионов кобальта. Другие металлы оказывают угнетающее действие. Наиболее заметное ингибирующее влияние оказывают Cu, Zn, Ni, менее - Ca, Fe, Mn. Оптимальная концентрация Co^{++} для получения метионина культурой *Rh. palustris* составляет $10^{-3}M$, а для аланина - культурой *Rh. capsulatus* - $10^{-2}M$.

Таблица 4. Влияние ионов металлов на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б.с/час)

Ионы металлов, $10^{-3}M$	<i>Rh. palustris</i>	<i>Rh. capsulatus</i>
	метионин	аланин
Cu	32,3	41,5
Mg	49,7	50,0
Ca	53,6	38,9
Zn	28,0	30,2
Mn	88,7	98,9
Fe	82,5	80,1
Co	130,8	145,3
Ni	30,0	38,0
Контроль	100,8	120,3

Максимальная ацилазная активность проявляется в начале стационарной фазы роста, что соответствует 48 ч культивирования, тогда как максимальное накопление биомассы имеет место на четвертые сутки выращивания (рис. 1).

Установлено, что оптимальное значение pH для деацилирования отдельных аминокислот находится в пределах 7,5-8,5.

Нами были применены разные методы инкубирования фототрофных бактерий для увеличения ацилазной активности.

Клетки фототрофных бактерий обрабатывались различными органическими растворителями, известными как вещества, увеличи-

вающие проницаемость клеток и способствующие активности ферментов. Клетки бактерий до внесения в инкубационную смесь держали в одном из следующих растворителей: толуоле, спирте, хлороформе, ацетоне в течение 5, 10, 20 мин (табл. 5). Ацилазная активность повышалась, когда клетки обрабатывались ацетоном и толуолом, эффект был заметен иногда даже при небольших сроках обработки - 5, 10 мин. При 20-минутной обработке значительно увеличивалась степень гидролиза ацетил DL-метионина.

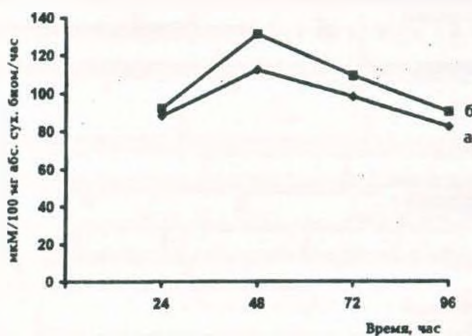


Рис. 1. Ацилазная активность в динамике роста:
а - *Rh. palustris* (метионин);
б - *Rh. capsulatus* (аланин)

Таблица 5. Влияние обработки клеток органическими кислотами на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б./час)

Органические растворители	<i>Rh. palustris</i> (метионин)			<i>Rh. capsulatus</i> (аланин)		
	5 мин	10 мин	20 мин	5 мин	10 мин	20 мин
Спирт	95,6	101,2	108,0	98,7	98,0	107,5
Ацетон	106,3	106,5	120,3	28,0	125,7	131,4
Хлороформ	80,9	88,7	89,0	90,3	89,0	89,6
Толуол	102,8	104,7	122,4	125,0	123,4	125,6
Контроль	98,7			110,3		

Известно, что поверхностно активные вещества (ПАВ) оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на ферментативную активность различных микроорганизмов. Показано, что прединкубирование фототрофных бактерий с разными твинами в концентрации 0,1% в течение 24 ч приводит к увеличению ацилазной активности (табл. 6). Наиболее положительное действие отмечено в вариантах с твин-40 и твин-80.

Таблица 6. Влияние ПАВ на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б./час)

ПАВ	<i>Rh. palustris</i> (метионин)	<i>Rh. capsulatus</i> (аланин)
Твин-40 (эфир пальмитиновой к-ты)	140,8	149,9
Твин-60 (эфир стеариновой к-ты)	98,8	107,7
Твин-80 (эфир олеиновой к-ты)	142,3	136,5
Контроль	108,3	116,2

Таким образом, все исследованные штаммы фотосинтезирующих бактерий проявляют аминоксилазную активность. Ацилазы фототрофных бактерий обладают широким спектром субстратной специфичности. При подборе оптимальных условий культивирования и методов обработки аминоксилазную активность фототрофных бактерий можно значительно повысить.

Полученные результаты позволяют более активно изучать группы фототрофных бактерий с целью поиска новых перспективных продуцентов аминоксилаз.

Авторы выражают глубокую признательность академику Африкян Эврикю Гегамовичу за научную консультацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аболинь Т.К. В сб.: Управление микробным синтезом, 76-82, Рига 1977.
2. Африкян Э.К. Микробные ацилазы. Микробиологический синтез, 1, 17, 1967.
3. Кимура Ю., Африкян Э.К. ДАН СССР, 173, 4, 945-947, 1967.
4. Цыганков А.А., Гоготов И.Н., Кондратьева Е.Н. Микробиология, 53, 3, 392-398, 1984.
5. Элиазян А.А., Паронян А.Х., Африкян Э.К. Биотехнология, 6, 51-54, 1997.
6. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 21, 5, 304-307, 1957.
7. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 24, 1, 31-36, 1960.
8. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 24, 1, 37-44, 1960.
9. Kitai K., Jaoping I., Gary P. J. Bacteriol., 181, 3, 1698-1702, 1999.
10. Terzenbach D. P., Blaut M. Arch. Microbiol., 169, 2, 503-508, 1998.

Поступила 10.X.2000