АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

А.А. ЭЛИАЗЯН, А.Х. ПАРОНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Изучение ферментативной активности фототрофных бактерий, выделенных из разных экологических зон Армении, выявило ряд штаммов с аспартазной, аминоксилазной, глюкозоизомеразной и аспарагиназной активностью. Подобраны оптимальные условия культивирования и инкубирования, обеспечивающие ферментативную активность фототрофных бактерий. Уровень активности изучаемых ферментов наиболее высок у несерных пурпурных бактерий.

Установлено, что биосинтез указанных ферментов штаммоспецифичен, у штаммов одного вида наблюдается активность разного уровня.

Հայաստանի էկոլոգիական տարբեր գոտիներից անջատված ֆոտոտրոֆ բակտերիաների ֆերմենտային ակտիվության ուսումնասիրությունը բացահայտել է ասպարտազային, ամինոազիլազային, գլյուկոզիզոմերազային և ասպարագինազային ակտիվությամբ օժտված մի շարք շտամներ: Ընտրվել են ֆերմենտային ակտիվությունն ապահովող աճի և ինկուբացիայի օպտիմալ պայմանները: Ուսումնասիրվող ֆերմենտների ակտիվության մակարդակը ավելի բարձր է ոչ ծծմբային պուրպուր բակտերիաների մոտ:

Հաստատվել է, որ նշված ֆերմենտներին բնորոշ է շտամային առանձնահատկությունը և միևնույն տեսակին պատկանող տարբեր շտամներ ունեն ակտիվության տարբեր մակարդակ:

The fermentation activity of phototrophic bacteria isolated from different ecological zones of Armenia has been studied. The series of strains with aspartase, aminoacylase, glucosoisomerase and asparaginase activity have been revealed. The optimal cultivation and incubation conditions for biosynthesis and enzymatic activity of phototrophic bacteria have been investigated. The level of activity of the enzymes is most high in nonsulfur purple bacteria.

The biosynthesis of enzymes mentioned is strain specific and the strains of one species have various level of activity.

Фототрофные бактерии - аспартаза - аминоксилаза - глюкозоизомеразы - аспарагиназа

Возможности использования фототрофных бактерий (ФБ) весьма разнообразны. Способность к преобразованию солнечной энергии и росту на дешевых питательных средах дает возможность использовать их в биотехнологии как выгодные продуценты для получения ценных биологически активных соединений - витаминов, аминокислот, ферментов, полисахаридов, пигментов и т.д. [2, 4, 14, 16]. Биомасса ФБ может служить источником полноценного кормового белка с высокой степенью переваримости.

Несомненный интерес представляют выявление и изучение ферментов, участвующих в важных метаболических процессах и определяющих их

экофизиологию и видовое разнообразие. Среди ФБ описаны многочисленные штаммы с высокой гидрогеназной, каталазной, нитрогеназной активностью [4, 8, 15]. Однако весьма мало сведений о таких широко распространенных у других групп микроорганизмов ферментах, как аспартаза, ацилазы, глюкозоизомераза и аспарагиназа. Наша задача заключалась в выяснении наличия и изучении активности вышеуказанных ферментов у представителей ФБ, в том числе их алкалофильных форм, выделенных из разных экологических зон Армении.

Материал и методика. Объектом исследований были пурпурные бактерии родов *Rhodobacter* (14 шт.), *Rhodospseudomonas* (2 шт.), *Rhodospirillum* (1 шт.), *Chromatium* (2 шт.), *Ectothiorhodospira* (1 шт.), выделенных из различных экологических ниш Армении. Культуры, отличавшиеся высокой ферментативной активностью депонированы в Республиканском Центре депонирования микробов под номерами ИНМИА 6505-6510.

Несерные пурпурные бактерии выращивали на среде Ормеруда [9], а серные - на среде Пфеннига [11], в люминостате при освещении 1500-2000 люкс и температуре 28-30°. Рост культур оценивали по измерению оптической плотности суспензий при 660 нм на спектрофотометре СФ-26, а также определением веса сухой биомассы.

Аспартазную активность определяли методом Чибата и др. [7]. Ферментативную активность устанавливали по выходу образовавшейся аспарагиновой кислоты, рассчитанной на 100 мг сухой биомассы.

Аминоацилазную активность определяли методом Чибата и др. [6] и выражали в мкМ/ч/100 мг сухой биомассы.

Глюкозоизомеразную активность определяли по количеству образовавшейся фруктозы тиобарбитуровым методом [10] и выражали в мкг фруктозы/ч/мг сухой биомассы.

Аспарагиназную активность определяли методом Робертс и др. [13]. Активность выражали в Международных единицах (МЕ), что соответствует количеству L-аспарагиназы, необходимой для освобождения 1 мкМ аммония за 1 мин при 37°.

Результаты и обсуждение. **Аспартазная активность.** Фермент аспартаза (L-аспаратат аммоний лиаза, КФ 4.3.1.1) катализирует присоединение аммиака к фумарату с образованием L-аспаргата. Превращение фумарата в L-аспарагиновую кислоту с помощью микробного фермента аспаргазы давно служит основой для получения аспарагиновой кислоты в промышленных масштабах [7].

Известно, что наиболее активные продуценты аспартазы встречаются среди *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*. Слабой активностью или ее отсутствием характеризуются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты [12].

Проведенные нами исследования подтверждают, что большая часть ФБ проявляет аспартазную активность, среди них наибольшей активностью отличались *R.sphaeroides* шт. D-10, *R.rubrum*, шт. A-3, *R.palustris*, шт. D-6 (табл.1).

Выход аспарагиновой кислоты наибольший у *R.palustris*, шт. D-6. Наши дальнейшие исследования проводились с этим штаммом.

Известно, что для биосинтеза аспартазы у микроорганизмов существенное значение имеют источники питания, наличие в питательной среде биологически активных соединений, фаза роста, условия культивирования и др.

Нами было установлено оптимальное соотношение пептона и дрожжевого экстракта для накопления биомассы и ферментативной активности шт. D-6. При содержании в среде 2% пептона и 0,1% дрожжевого экстракта превращение фумарата в L-аспарагиновую кислоту составляло 84-86%. Экспериментально были установлены оптимальная температура, рН, концентрация фумарата, продолжительность инкубирования, изучалось влияние ионов металлов и других

факторов на степень превращения фумарата в аспарагиновую кислоту. Оптимальная температура роста и ферментативной активности 37°, концентрация фумарата аммония — 15%. Оптимальное значение рН — 8,5.

Таблица 1. Аспартазная активность ФБ

Штаммы	% L-аспарагиновой кислоты на 100 мг сухой биомассы	Штаммы	% L-аспарагиновой кислоты на 100 мг сухой биомассы
<i>R.sphaeroides</i> , шт. D-1	28,0	<i>R.capsulatus</i> , шт. D-1	18,5
шт. D-2	19,7	<i>R.palustris</i> , шт. D-6	34,0
шт. D-3	27,5	<i>R.rubrum</i> , шт. А-3	32,8
шт. D-5	16,6	<i>Chromatium sp.</i> , шт. Ал-1	19,1
шт. D-8	30,7	шт. С-1	12,6
шт. D-10	31,5	<i>Ectothiorhodospira</i> , Ал-2	22,1
<i>sp.</i> , шт. Ал-2	29,4		

Продолжительность инкубирования для эффективного превращения фумарата составляла 24 ч. Есть сведения, что в стационарных условиях продолжительность инкубирования активных продуцентов иногда достигает 48 ч [12]. Дальнейшее инкубирование ощутимых результатов не дало. Не замечено существенного различия в действии на активность аспартазы ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} .

Толуолизация и ультразвуковая обработка клеток на дезинтеграторе почти не увеличили аспартазную активность.

Таким образом, несерные пурпурные бактерии впервые охарактеризованы нами как организмы, обладающие аспартазной активностью, среди них выявлены активные продуценты фермента.

Аминоацилазная активность. Одним из перспективных путей получения оптически чистых аминокислот является разделение рацемических смесей аминокислот с применением микробных ацилаз (КФ 3.5.1.14). В настоящее время исследования микробных ацилаз проводятся в целях поиска более активных продуцентов и определения характеристики ацилазной системы для выявления ее биологического значения и возможностей направленного биосинтеза [16].

Проведенные нами исследования показали, что большое число несерных пурпурных бактерий, выделенных из различных минеральных источников Армении, проявляет ацилазную активность в отношении нескольких ацилпроизводных аминокислот. Из изученных 40 штаммов ацилазной активностью обладали 27, а некоторые из них обладали достаточно высокой активностью к ацилпроизводным метионина, аланина, фенилаланина (табл. 2).

Для выявления оптимальных условий биосинтеза ацилаз и регуляции активности фермента были отобраны *R.capsulatus*, шт. А-5 и *R.palustris*, шт. D-6, отличавшиеся выраженной ацилазной активностью. Показано, что на выход биомассы и ацилазную активность благоприятно действуют некоторые органические добавки: пептон, кукурузный и дрожжевой экстракты. При наличии в питательной среде 1% дрожжевого экстракта образование аланина, шт. А-5 увеличивается на 32,6%, метионина, шт. D-6 — 28,9% (табл. 3). Заметно

увеличивается также биомасса. Такой же положительный эффект получается при наличии пептона.

Таблица 2. Ацилазная активность НПБ, выделенных из минеральных источников, мкМ аминокислоты/100 мг сух. биомассы/ч

Штаммы	Ацетил DL-				
	метионин	аланин	серин	фенил-аланин	триптофан
<i>R.sphaeroides</i> , шт. D-1	55,2	60,7	21,5	99,8	12,5
шт. D-2	44,6	56,6	16,1	86,7	8,4
шт. D-3	68,7	35,5	6,9	57,8	3,1
шт. D-8	59,5	42,0	12,2	56,5	7,9
шт. D-10	58,6	40,5	11,9	55,5	7,3
<i>R.capsulatus</i> , шт. D-4	87,5	110,0	8,7	122,4	5,6
шт. A-5	120,7	130,2	53,5	130,2	2,9
<i>R.palustris</i> , шт. D-6	126,3	92,7	84,3	108,9	10,3
<i>R.rubrum</i> , шт. A-3	38,8	118,7	33,4	90,0	3,7
<i>R.sulfidophilus</i> , шт. Ш-1	41,2	32,7	12,2	110,4	4,8

Таблица 3. Влияние питательной среды на рост и ацилазную активность, мкМ аминокислоты/100 мг абсолютно сухой биомассы/ч

Добавки к питательной среде, 1%	<i>R.capsulatus</i> , шт. D-4		<i>R.palustris</i> , шт. D-6	
	рост, OD ₆₆₀ нм	аланин	рост, OD ₆₆₀ нм	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

При изучении влияния ацилпроизводных аланина и метионина в качестве индукторов в количестве 0,01% повышение ацилазной активности не отмечается, а рост биомассы несколько угнетается.

Известно, что ионы некоторых металлов, особенно кобальта, в большинстве случаев стимулируют ферментативную активность микроорганизмов. Оптимальная концентрация Co^{2+} для получения метионина, шт. D-6 — $10^{-3}M$, для аланина, шт. A-5 — $10^{-2}M$. Ионы других металлов угнетают ацилазную активность указанных штаммов, особенно заметное ингибирующее действие оказывают ионы Cu, Zn, Ni, менее - Ca, Fe, Mn (табл. 4).

Максимальная ацилазная активность проявляется в начале стационарной фазы роста, при 48 ч культивирования, максимальный рост биомассы происходит на четвертые сутки выращивания. Оптимальное значение pH для деацилирования отдельных аминокислот 7,5-8,5.

Несколько повышается ацилазная активность при обработке клеток ФБ толуолом или ацетоном в течение 5-10 мин. Предынкубирование ФБ с разными твинами в концентрации 0,1% приводит к положительным результатам.

Таблица 4. Влияние ионов металлов на ацилазную активность, мкМ/100 мг сух. биомассы/ч

Ионы металлов, 10 ⁻³ М	<i>R.palustris</i> , шт. D-6	<i>R.capsulatus</i> , шт. D-4
	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

Наиболее заметное действие оказывают твин-40 и твин-80.

Таким образом, согласно полученным данным, многие изученные нами ФБ обладают высокой аминокислотной активностью широкого спектра действия, и это позволяет более активно изучать эту группу ФБ с целью поиска новых перспективных продуцентов аминокислот.

Глюкозоизомеразная активность. Фермент глюкозоизомеразы (D-глюкоз-6-фосфаткетол-изомеразы, КФ 5.3.1.9) используется в производстве сахаристых продуктов для превращения глюкозы во фруктозу. Глюкозоизомеразы были обнаружены у ряда бактерий, актиномицетов [3].

Таблица 5. Глюкозоизомеразная активность ФБ

Штаммы	Активность ФБ, мкг фруктозы/ч/мг сух. биомассы	Штаммы	Активность ФБ, мкг фруктозы/ч/мг сух. биомассы
<i>R.sphaeroides</i> , шт. А-8	17,0	<i>R.capsulatus</i> , шт. D-4	10,9
шт. А-10	18,6	шт. А-5	9,5
шт. А-16	16,3	<i>R.palustris</i> , шт. D-6	8,3
шт. D-2	18,1	шт. А-7	7,5
шт. D-10	24,9	<i>R.rubrum</i> , шт. А-3	20,0

Изученные нами ФБ в той или иной степени проявили способность к изомеризации глюкозы во фруктозу. Среди них были обнаружены культуры с достаточно высокой ферментативной активностью (табл. 5).

Глюкозоизомеразной активностью особенно отличалась культура *R.sphaeroides*, шт. D-10.

Максимальная активность фермента наблюдается у 48-часовой культуры, т.е. в начале стационарной фазы роста.

Скорость ферментативного превращения глюкозы во фруктозу зависит от начальной концентрации глюкозы в реакционной смеси. Нами были испытаны три концентрации глюкозы - 1, 2 и 3 М, оптимальной является 1 М.

У большинства продуцентов глюкозоизомеразы отличается относительной

термостабильностью, что позволяет вести процесс при температуре, исключающей возможность заражения посторонней микрофлорой. Нами были выбраны три режима температуры - 40°, 60° и 80°. Активность фермента при 60° и 80° находилась почти на одном уровне - 31,0 и 32,3 мг фруктозы/ч/мг сухой биомассы соответственно, что указывает на термостабильность фермента ФБ.

Оптимальное значение рН проверяли в зоне 6,0-9,0. Высокую глюкозоизомеразную активность клетки проявили при рН 7,0.

Таким образом, в результате проведенных исследований у ФБ была обнаружена глюкозоизомеразная активность, что весьма важно для метаболизма углеводов, которые для них могут служить одновременно и источником углерода, и донором электрона. Наиболее активной оказалась культура *R.sphaeroides*, шт. D-10.

Аспарагиназная активность. L-аспарагиназа (L-аспарагинамидогидролаза, КФ 3.5.1.1) является гидролизующим ферментом, который участвует в гидролизе аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты. Фермент, выделенный из *Escherichia coli*, оказался эффективным лекарственным препаратом при лейкемии, при инфицировании в кровь он снижает поступление в опухолевые клетки экзогенного аспарагина, необходимого для их быстрого роста. Однако под действием этого фермента поражаются также ткани с низкой активностью аспарагинсинтетазы, что ограничивает клиническое использование аспарагиназы. L-аспарагиназа играет важную роль также в метаболизме аминокислот у микроорганизмов.

Фермент L-аспарагиназа у ФБ мало изучен [13]. Нами было проведено сравнительное изучение аспарагиназной активности ФБ, выделенных из минеральных источников и солончаковых почв Армении. Высокая ферментативная активность отмечена у НПБ (табл. 6), а низкая - у серных фотобактерий.

Таблица 6. Аспарагиназная активность НПБ

Штаммы	Активность, МЕ/г сух. биомассы
<i>R.sphaeroides</i> , шт. D-1	6,93
шт. D-2	5,10
шт. D-3	22,50
шт. D-8	15,00
шт. D-9	15,30
шт. D-10	15,80
<i>R.capsulatus</i> , шт. D-4	17,78
шт. A-5	14,2
шт. D-5	12,05
<i>R.palustris</i> , шт. D-6	7,73
шт. A-7	5,85
<i>R.rubrum</i> , шт. A-3	19,75

Изучали также влияние ряда факторов на активность ФБ, а именно температуру, рН, индукцию субстратом, длительность инкубации. В опытах по

индукции аспарагиназы источники углерода и азота в среде заменяли L-аспарагином (3 г/л).

Показано, что оптимальная температура для проявления ферментативной активности у шт. Д-3 — 52°, она с незначительными изменениями сохраняется до 58°, затем резко падает. Активность для шт. А-3 — 45°. Оптимальный рН для шт. Д-3 — 8,8, а для шт. А-3 — 8,5.

Данные исследований показали, что на индуктивной среде аспарагиназная активность увеличивается почти в 2,5. При повторных индукциях она опять значительно увеличивается, однако после четырехкратной индукции резко снижается.

Заметное влияние на аспарагиназную активность оказал возраст посевного материала. Активность была намного выше у 48-часовых культур (табл. 3).

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно заключить, что в оптимальных условиях роста и биосинтеза фермента изучаемые культуры могут проявлять достаточно высокую аспарагиназную активность.

Следует отметить, что ферментативная активность у ФБ штаммоспецифична, и у штаммов одного вида наблюдается активность разного уровня. Благодаря активной ферментативной деятельности, фототрофные бактерии эффективно адаптируются к окружающей среде и способны существовать в разных экологических нишах. Различия в ферментативной активности культур являются результатом влияния экологических факторов, с помощью которых и реализуются видовые и штаммовые различия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э.К. Микробиологический синтез, 1, 1, 1-7, 1967.
2. Сергеев А.В., Самохвалов Т.И., Вакулова Л.А., Шишукина М.Я. Материалы симпозиума, М., Онкологический научный центр РАМН, 4-8, 1998.
3. Улезло И.В., Тулеулова Е.Т., Безбородов А.М. Прик. биохимия и микробиология, 16, 4, 561-568, 1980.
4. Цыганков А.А., Лауриновичене Т.В., Гоготов И.Н. Прик. биохимия и микробиология, 33,1, 24-27, 1997.
5. Элиазян А.А., Паронян А.Х., Африкян Э.К. Биотехнология, 6, 51-54, 1997.
6. Chibata I., Kisumi M., Yamada S. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22, 1, 24-31, 1958.
7. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 24, 1, 31-36, 1960.
8. Kitai K., Jaoping I., Gary P. J. Bacteriol., 181, 3, 1698-1702, 1999.
9. Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H. Arch. Biochem. Biophys., 94, 2, 449-463, 1991.
10. Percheron F. Compt. Rend. Acad. Sci., 255, 2221-2225, 1962.
11. Pfennig N. Arch. Mikrobiol., 42, 1, 90-93, 1962.
12. Plachy I., Sikyta B. Folia Microbiol., 22, 3, 440-444, 1997.
13. Roberts J., Burson G., Hill J. J. Bacteriol., 95, 6, 2117-2123, 1968.
14. Straub K., Rainey f., Widdel F. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 729-735, 1999.
15. Terzenbach D.P., Blaut M. Arch. Microbiol., 169, 6, 503-508, 1998.
16. Tsubocura A., Hisashi Y., Mikihiro T., Takashi K. Bacteria for production of carotenoids. Patent USA 5858761, 1997.

Поступила 14.X.2003