

Активность ферментов углеводного обмена *Streptomyces imbricatus* — продуцента имбрицина в процессе регуляции биосинтеза антибиотика

О. В. ТОПКОВА, Е. П. ЯКОВЛЕВА, В. А. КОЛОДЯЗНАЯ

ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Activity of Carbohydrate Metabolism Enzymes in *Streptomyces imbricatus*, Producing Imbricin in Controlled Biosynthesis of the Antibiotic

O. V. TOPKOVA, E. P. YAKOVLEVA, V. A. KOLODYAZNAYA

St. Petersburg State Chemico-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg

Исследовали изменение ферментативной активности культуры *Streptomyces imbricatus* в условиях стимуляции биосинтеза имбрицина при внесении в питательную среду сырца эндорегуляторного соединения. Определяли активность двух основных ферментов гликолиза — фосфофруктокиназы и фруктозо-1,6-дифосфатаальдозы (альдозы), а также оценивали функционирование пентозофосфатного пути по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы. Показано, что в условиях эндорегуляции усиление образования имбрицина происходит на сравнительно высоком уровне катаболизма глюкозы как по гликолитическому, так и по пентозофосфатному пути, обеспечивая биосинтез антибиотика необходимыми предшественниками и восстановительными эквивалентами.

Ключевые слова: имбрицин, гликолиз, пентозофосфатный путь, эндорегулятор.

Changes in the fermentative activity of *Streptomyces imbricatus* under the conditions of stimulated biosynthesis of imbricin with addition of a crude endoregulator to the medium were studied. The activity of the two main enzymes of the glycolysis, i. e. phosphofruktokinase and fructose-1,6-diphosphate aldolase (aldolase) was determined and the functioning of the pentozophosphate pathway was estimated by the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-specific glutamate dehydrogenase. Under the conditions of the endoregulation the increase of the imbricin production was observed when the level of the glucose catabolism either by the glycolytic pathway or by the pentozophosphate pathway was comparatively high, thus providing the antibiotic biosynthesis with the required precursors and reducing equivalents.

Key words: imbricin, glycolysis, pentozophosphate pathway, endoregulator.

Ранее проведёнными исследованиями было показано, что культура стрептомицета *Streptomyces imbricatus* — продуцента неполиенового противогрибкового антибиотика имбрицина — в процессе жизнедеятельности образует эндогенное соединение, обладающее способностью значительно (на 40—50%) стимулировать биосинтез собственного антибиотика имбрицина [1].

Согласно данным литературы, биологическое действие многих ауторегуляторов сводится к тому, что они активируют ферментативные процессы, оказывая влияние на какое-либо звено в обмене веществ микроорганизмов [2—4]. Для объяснения механизма действия эндорегулятора *S.imbricatus* мы исследовали его влияние на активность некоторых ферментов углеводного обмена в процессе

развития продуцента имбрицина. При этом необходимо было выяснить, с какими биохимическими изменениями в процессе ферментации связано увеличение синтеза антибиотика.

Цель данного исследования — изучение влияния эндорегулятора *S.imbricatus* на активность некоторых ферментов гликолиза и пентозофосфатного цикла.

Материал и методы

В опытах использовали культуру стрептомицета *Streptomyces imbricatus* штамм ЛИА 0112/90, вариант 9М, полученный Сухаревич М. Э. [5] из *S.imbricatus* ЛИА 0112/90 путём обработки штамма ЛИА 0112/90 УФ-лучами и химическим мутагеном. Вариант 9М отличается от исходного большей продуктивностью (2500±250 мкг/мл).

Посевной материал выращивали на комплексной соевоглюкозной среде в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл, объём среды — 50 мл, на качалке (220 мин⁻¹) при 27±1°С, в течение 48 ч. Полученный посевной материал трижды отмывали стерильной очищенной водой и затем вносили в среду для ферментации в количестве 10% по объёму. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера, на качалке (220 мин⁻¹) при

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

27±1°C, в течение 96 ч, на синтетической питательной среде следующего состава: глюкоза — 4,5%; крахмал растворимый — 5,5%; аммоний сернокислый — 0,05%; калий хлористый — 0,4%; мел х. о. — 0,8%; pH до стерилизации — 7,4—7,6. Объём среды в колбе — 30 мл.

В качестве фактора, стимулирующего биосинтез имбрицина, использовали внесение в ферментационную питательную среду сырца эндорегулятора, полученного по методике, описанной ранее [6]. Сырец вносили в количестве 12 мг/мл среды. В качестве контроля проводили ферментацию *S.imbricatus* на среде без внесения эндорегуляторного соединения.

Определение содержания имбрицина в культуральной жидкости проводили спектрофотометрическим методом [5] на спектрофотометре Shimadzu UVmini-1240 (Япония).

Определение энзиматической активности проводили в неразрушенном мицелии *S.imbricatus*. Культуральную жидкость охлаждали до 6—8°C, мицелий отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин, трижды промывали его холодной очищенной водой и тщательно отжимали между листами фильтровальной бумаги. Для анализов брали определенную навеску влажного мицелия и ферментативную активность пересчитывали на 100 мг абсолютно сухого мицелия. Сухой вес и влажность мицелия определяли с помощью влагомера MA-45 Sartorius.

Определение активности альдолазы проводили по методике, описанной Пинто с соавт. [7]. К 25 мг влажного мицелия добавляли 1,6 мл 0,05 М трис-буфера (pH 7,4) и 0,2 мл 0,056 М раствора гидразинсульфата. Смесь выдерживали в течение 5 мин в термостате при 37°C и добавляли 0,2 мл 0,05 М раствора фруктозо-1,6-дифосфата. Через 30 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 2 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием. К 0,5 мл надосадочной жидкости добавляли равный объём 0,75 н раствора NaOH. Пробу выдерживали 10 мин при комнатной температуре, после чего к ним добавляли по 0,5 мл 0,1% раствора 2,4 — динитрофенилгидразина в 2 н хлористоводородной кислоте. Смесь перемешивали и помещали в термостат при 37°C на 10 мин. По истечении указанного времени к пробам добавляли 3,5 мл 0,75 н раствора NaOH, тщательно перемешивали, через 5 мин на спектрофотометре измеряли оптическую плотность проб при 540 нм. Количество образовавшихся триоз определяли, используя стандартную кривую, построенную по диоксиацетону.

При определении активности фосфофруктокиназы реакционная смесь содержала 25 мг влажного мицелия, 0,15 мл 0,1 М раствора АТФ, 0,2 мл 0,1 М раствора хлористого магния, 0,2 мл 0,056 М раствора гидразинсульфата и 1,25 мл трис-НС1-буфера (pH 7,4). Проведение ферментативной реакции и методика определения содержания образующихся триоз были аналогичны описанным для альдолазы.

Определение активности дегидрогеназ проводили по методу, предложенному Л. Г. Логиновой и Э. П. Гужевой [8]. Субстратами для определения дегидрогеназной активности являлись глюкоза-6-фосфат и глутаминовая кислота. Концентрация растворов субстратов — 0,01 М, pH 7,0—7,2.

В ходе исследований осуществляли отбор проб начиная с 24 ч роста продуцентов с интервалом времени 24 ч. В полученных пробах проводили определение содержания редуцирующих веществ — по методу Пеха и Треси [9]; содержания аминокислот — по методу Попе и Стивенсона [10].

Результаты и обсуждение

Изменение ферментативной активности стрептомицета исследовали в условиях стимуляции биосинтеза имбрицина при внесении в син-

тетическую питательную среду сырца эндорегулятора. В качестве контроля использовали ферментацию *S.imbricatus* на среде без внесения эндорегуляторного соединения.

Первоначально определяли активность двух основных ферментов гликолиза — фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) и фруктозо-1,6-дифосфата альдолазы (альдолазы) (КФ 4.1.2.13). Именно в результате фосфофруктокиназной реакции происходит разветвление различных путей превращения углеводов в клетке, осуществляется регуляция гликолиза. Второй фермент — альдолаза — катализирует разрыв фруктозо-1,6-дифосфата на две триозы и является ключевым ферментом гликолиза.

На рис. 1 представлены данные по содержанию указанных выше ферментов гликолиза в динамике роста культуры *S.imbricatus* в контрольных и опытных (в присутствии регулятора) условиях.

Как видно из рис. 1а, характер изменения активности фосфофруктокиназы в течение всех четырёх суток выращивания продуцента был практически однотипным в контроле и опыте. Однако содержание этого фермента на 24 и 48 ч ферментации при добавлении в среду эндорегулятора было почти в 2 раза выше, чем в контроле.

Активность альдолазы в процессе развития *S.imbricatus* на среде с внесённым сырцом эндорегулятора и без его внесения также изменялась однотипно (рис. 1, б). В этом случае также отмечали существенные различия в количественном содержании альдолазы в опытных условиях, особенно в начальный период ферментации (до 48 ч). Количество этого фермента в опытных условиях на 48 ч культивирования составляло 33 ед против 21 ед в контроле.

При сравнении кривых, отражающих скорость потребления углеводов *S.imbricatus* и активность альдолазы в условиях стимуляции биосинтеза имбрицина (рис. 1, б), становится очевидным существование корреляции между этими параметрами. Следовательно, гликолитические процессы в клетках *S.imbricatus* под влиянием эндорегулятора значительно усиливаются по сравнению с контрольными условиями культивирования.

Высокая активность двух ключевых ферментов начальных этапов гликолиза свидетельствует о том, что утилизация углеводов по гликолитическому пути в начальные часы биосинтеза протекает более интенсивно в условиях стимуляции антибиотикообразования. В этот период ферментации в среде накапливаются промежуточные метаболиты, потребляемые как на рост продуцента, так и на синтез малонатных единиц. Полученные в ходе исследований результаты объяснимы, поскольку известно, что в процессе метаболизма глюкозы по гликолитическому пути образуется фосфоенолпируват, который участвует в образо-

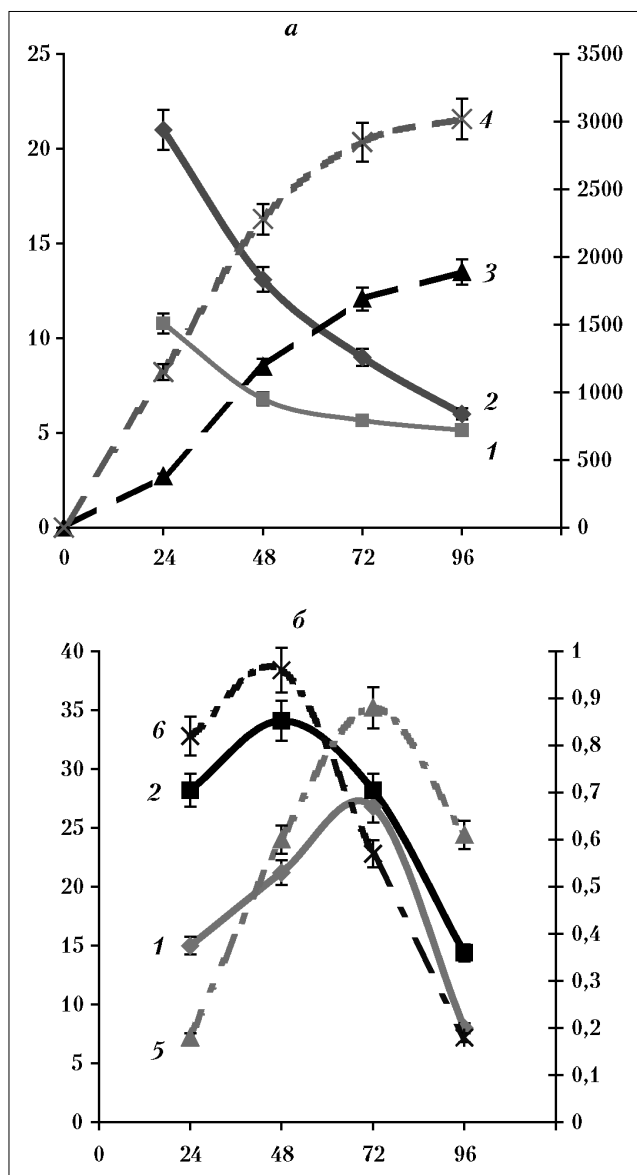


Рис. 1. Активность ферментов гликолиза при выращивании *S.imbricatus* на синтетической среде (контроль) и в присутствии сырца эндорегулятора (опыт).

a – фосфофруктокиназа; *б* – альдолаза. По оси абсцисс – время культивирования, ч. По осям ординат: рис. 1, *a* – удельная активность фосфофруктокиназы, мкмоль ДОА/100 мг сухого мицелия (левая ось) и активность КЖ, мкг/мл (правая ось); рис. 1, *б* – удельная активность альдолазы, мкмоль ДОА/100 мг сухого мицелия (левая ось) и скорость утилизации углеводов, мг/ч (правая ось).

Кривые 1 и 2 – удельная активность ферментов; кривые 3 и 4 – накопление имбрицина в КЖ; кривые 5 и 6 – скорость утилизации углеводов. Кривые 1, 3, 5 – контроль, кривые 2, 4, 6 – опыт.

вании промежуточных метаболитов, ответственных за синтез макролактонового кольца молекулы имбрицина. Изменение функционирования гликолиза при использовании сырца эндорегулятора

обеспечивает перераспределение пирувата в сторону образования малонатных единиц, составляющих молекулу антибиотика.

Функционирование пентозофосфатного пути у продуцента имбрицина *S.imbricatus* в условиях ауторегуляции биосинтеза антибиотика оценивали по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), катализирующей реакцию превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат – ключевую реакцию этого пути. Эксперименты включали также определение глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.), вследствие ее специфичности к НАДФ и регулирующего воздействия на синтез глутаминовой кислоты, которая является предшественником аргинина. Аргинин, в свою очередь, может являться донором гуанидиновой группировки, входящей в состав боковой цепи молекулы имбрицина.

На рис. 2, *a* представлены результаты изучения изменения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ). В течение первых двух суток наблюдали увеличение активности этого фермента как при выращивании *S.imbricatus* в обычных условиях на синтетической питательной среде, так и в условиях ауторегуляции, то есть с добавлением в питательную среду сырца эндорегулятора. Однако в первые 24 ч культивирования активность Г-6-ФДГ в контроле была выше (400 ед), чем в опытных вариантах (100 ед). Это свидетельствует о преобладании гликолитического пути утилизации глюкозы в данный период ферментации в присутствии эндорегулятора. Но уже к 48 ч культивирования величина энзиматической активности в присутствии эндорегулятора стала выше, чем в контроле, на 40–42%. Именно в этот период происходит переключение утилизации глюкозы с гликолиза на пентозофосфатный путь, что совпадает с началом интенсивного синтеза антибиотика и формированием циклических структур. В дальнейшем активность Г-6-ФДГ в контроле значительно снижалась, а в присутствии эндорегулятора оставалась до конца культивирования на достаточно высоком уровне. В эти же часы ферментации наблюдали значительную разницу в уровне антибиотикообразования в контрольных и опытных условиях (рис. 2, *a*, кривые 3 и 4).

Активность НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы (рис. 2, *б*) у продуцента имбрицина в целом была значительно ниже, чем активность Г-6-ФДГ. Однако в присутствии эндорегулятора на 24 ч ферментации величина активности глутаматдегидрогеназы превышала контрольные значения в 4 раза (330 ед против 75 ед). Это может быть связано не только с участием данного фермента в регенерации НАДФ • Н₂ у *S.imbricatus*, но и с интенсивным

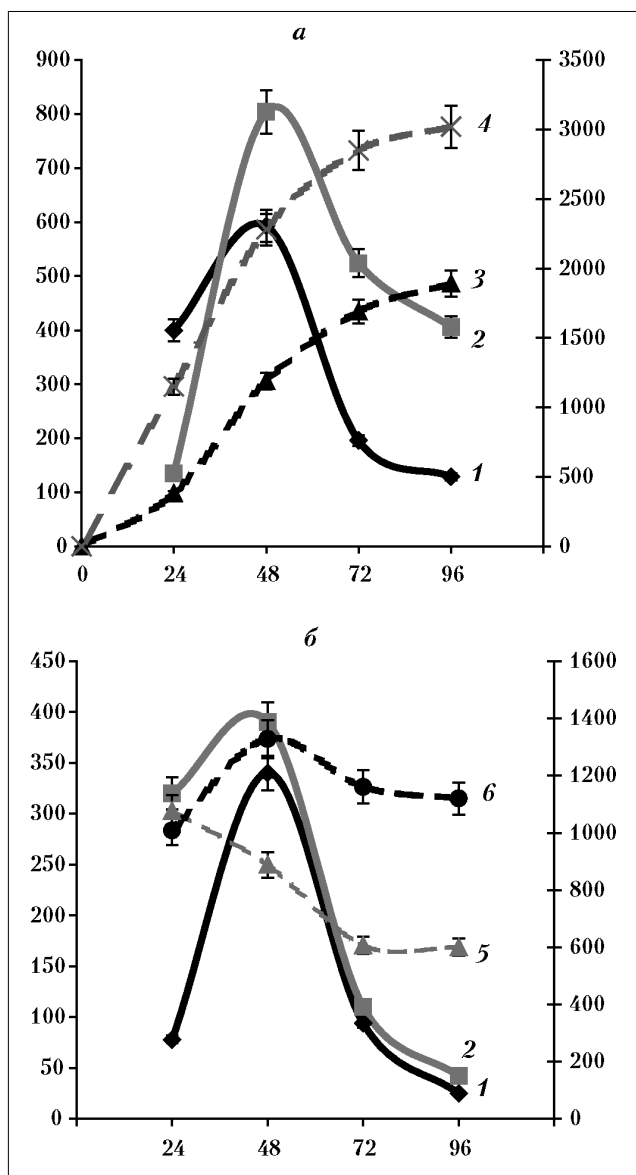


Рис. 2. Активность ферментов пентозофосфатного цикла при выращивании *S.imbricatus* на синтетической среде (контроль) и в присутствии эндорегулятора (опыт).

a – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; *б* – глутаматдегидрогеназа. По оси абсцисс – время культивирования, ч. По осям ординат: рис. 2, *a* – удельная активность Г-6-ФДГ, мкг ТТХ/100 мг сухого мицелия (левая ось) и активность КЖ, мкг/мл (правая ось); рис. 2, *б* – удельная активность глутаматдегидрогеназы, мкг ТТХ/100 мг сухого мицелия (левая ось) и содержание аминного азота, мг% (правая ось).

Кривые 1 и 2 – удельная активность ферментов; кривые 3 и 4 – накопление имбрицина в кж; кривые 5 и 6 – содержание аминного азота в кж. Кривые 1, 3, 5 – контроль; кривые 2, 4, 6 – опыт.

образованием в этот период глутаминовой кислоты, являющейся предшественником структурных единиц боковой цепи молекулы имбри-

цина. В последующие сутки культивирования активность глутаматдегидрогеназы в контрольном варианте резко увеличивалась и достигала величины активности фермента в условиях эндорегуляции. Полученные данные в значительной мере объясняют факт увеличения содержания аминного азота в первые часы ферментации (рис. 2, *б*, кривые 5 и 6). В дальнейшем глутаматдегидрогеназная активность стрептомицета в контроле и опыте была практически на одном уровне, резко снижалась к 72 ч культивирования и достигала минимальных значений к окончанию срока ферментации.

Известно, что молекула неполиенового антибиотика имбрицина представляет собой макроцикл с внутренним гемикеталем и присоединенной боковой цепью с гуанидиновой группировкой [11, 12]. Синтез лактонного кольца неполиенов происходит таким же образом, как и у полиеновых макролидов и антибиотиков тетрациклиновой структуры, то есть конденсацией малонатных и метилмалонатных единиц в поликетидную цепь с последующей её циклизацией. Синтез структурных единиц – малонатных и метилмалонатных групп – осуществляется из промежуточных продуктов гликолитического пути, а в образовании из них циклических структур, в восстановительных реакциях, исключительно большое значение имеет восстановленная форма НАДФ, которая образуется в результате реакций пентозофосфатного пути утилизации глюкозы [13].

Таким образом, установлено, что усиление образования имбрицина в присутствии эндорегулятора связано с более активным функционированием гликолиза, что обеспечивает повышенный синтез малонатных единиц, составляющих молекулу имбрицина. Одновременно происходит увеличение активности НАДФ-специфических систем, обеспечивающих биосинтез антибиотика необходимыми восстановительными эквивалентами.

Выводы

1. Усиление биосинтеза имбрицина при использовании сырца эндорегулятора сопряжено с более высоким уровнем катаболизма глюкозы как по гликолитическому, так и по пентозофосфатному путям.

2. Выявлено, что увеличение биосинтеза имбрицина в присутствии эндорегулятора связано с усилением активности систем, ответственных за регенерацию НАДФ•Н₂: отмечено увеличение активности НАДФ-специфичных дегидрогеназ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Топкова О. В., Яковлева Е. П., Яскович Г. А.* Изучение биосинтеза неполиенового антибиотика имбрицина на среде, содержащей фильтрат культуральной жидкости продуцента. *Антибиотики и химиотер* 2000; 45: 10. 5—9.
2. *Хохлов А. С.* Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. М.: 1988; 272.
3. *Gräfe U. et al.* Modification by genetic changes of the pleiotropic interference of butyrolactone-type autoregulators with differentiation of *Streptomyces griseus*. *Ztschr Allg Mikrobiol* 1984; 24: 515—523.
4. *Воронина О. И.* NAD- и NAD(P)-гликогидролазы микроорганизмов и их роль в развитии продуцентов. *Успех соврем биол* 1985; 99: 81—93.
5. *Сухаревич М. Э.* Регуляция биосинтеза имбрицина и механизм его действия на грибы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. СПб.: 1997; 156.
6. *Топкова О. В. и др.* Выбор способа выделения ауторегулятора из фильтрата культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. *Естествов тех науки* 2006; 3: 65—69.
7. *Pinto P. V. C., Dreal P. A., Kaplan A.* Aldolase. Colorimetric determination. *Clin Chem* 1969; 15: 339—345.
8. *Логина Л. Г., Гужева Э. П.* Дегидрогеназная активность термотолерантных дрожжей. *Микробиол* 1961; 30: 5: 917—920.
9. *Пех К., Треси М. В.* Биохимические методы анализа растений. М.: 1960; 116.
10. *Плешков Б. П.* Практикум по биохимии растений. М.: 1965; 255.
11. *Iwasaki S., Fukushima K., Namicoshi M., Sasaki K.* Studies on macrocyclic lactone antibiotics. V. The structures of azalomycin F_{3A} and F_{5A}. *Chem Farm Bull* 1982; 30: 4006—4021.
12. *Шенин Ю. Д.* Неполиеновые противогрибковые макролидные антибиотики. *Антибиотики и химиотер* 1991; 36: 10: 50—53.
13. *Martin J. F.* Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 1: 13—38.