УДК 579.841:582.232

Каракіс С. Г., ст. наук. сп., **Драгоєва О. Г.,** біолог,
Лавренюк Т. І., біолог, **Чабан Ю. Л.,** інженер
Одеський державний університет, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АКТИВНІСТЬ АСПАРТАТКІНАЗИ *SPIRULINA PLATENSIS* ЗА ВПЛИВУ АМІНОКИСЛОТ АСПАРАГІНОВОЇ РОДИНИ

З'ясовано вплив амінокислот аспарагінової родини на активність аспартаткінази трихомної ціанобактерії *Spirulina platensis*.
З'ясовано, що 80% загальної аспартаткіназної активності ферментного препарату підлягає кумулятивному інгібуванню L-треоніном та L-лізином. Решта аспартаткіназної активності інгібується також L-гомосерином.
Висловлюється припущення, що АК у *S. platensis* представлена принаймні двома ізоферментами.

Ключові слова: аспартаткіназа, активність, регуляція, *Spirulina platensis*.

Аспартаткіназа (АТФ: α-аспартат-4-фосфотрансфераза, КФ 2.7.2.4., далі АК), є першим ферментом розгалуженого шляху біосинтезу амінокислот аспарагінової родини: лізину, метионіну, треоніну та ізолейцину.

Дослідження АК представляє значний інтерес у зв'язку з великою різноманітністю форм цього ферменту та засобів регуляції його активності у мікроорганізмів [3—7, 11, 13]. Вивчення активності АК в присутності кінцевих продуктів розгалуженого шляху біосинтезу амінокислот аспарагінової родини в безклітинних екстрактах дає важливу інформацію про структуру та регуляцію активності цього ферменту [11].

Генетично зумовлені порушення регуляції аспартаткіназної активності часто призводять до сверхсинтезу амінокислот аспарагінової родини у мікроорганизмів [3]. Дослідження механізмів регуляції активності ключових ферментів шляхів біосинтезу амінокислот створюють теоретичну основу для селекції штамів-продуцентів амінокислот, а також для розробки методів оптимального культивування мікроорганизмів з метою підвищення виходу цільових продуктів. Проте у ціанобактерій, незважаючи на зростаюче використання їх у фотоавтотрофних біотехнологіях, біохімічні аспекти біосинтезу амінокислот аспарагінової родини майже не вивчались [4, 5].

Мета даної роботи — на основі вивчення впливу амінокислот аспарагінової родини на активність АК встановити шляхи регуляції активності цього ферменту у *S. platensis* — ціанобактерії, яка має велике практичне значення і є об'єктом культивування в багатьох країнах світу.

Матеріали та методи

В роботі використовували аксенічну культуру ціанобактерії *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., штам Moise (ODESU — 10), з колекції культур ціанобактерій Одесь-

© Каракіс С. Г., Драгоєва О. Г., Лавренюк Т. І., Чабан Ю. Л. 2000

кого державного університету [1]. Культуру вирощували в мінералізованому середовищі Зароука [14] при температурі 30 °С і освітленні 2—2,5 кЛк в колбах об'ємом 1 л з вмістом 400 мл середовища при продуванні повітрям. В пізній логарифмовій фазі росту клітини збирали шляхом фільтрування крізь мірошницький газ № 76, промивали на фільтрі 10-кратним об'ємом фізіологічного розчину та 1 об'ємом калій-фосфатного буфера (100 мМ, pH 7,0) з вмістом 20 мМ β-меркаптоетанолу. У роботі використовували частково очищений ферментний препарат АК (безклітинний екстракт, висолений сульфатом амонію), який готували за методом [8].

Активність аспартаткінази визначали методом Блека з деякими модифікаціями [10]. Стандартна реакційна суміш вміщала (об'єм 1 мл): 100 мМ калій-фосфатного буфера, pH 7,0; 100 мМ L-аспарагінової кислоти; 20 мМ АТФ; 20 мМ $MgCl_2$; 400 мМ гідроксиламіну; ферментний препарат (білок 3—5 мг/мл). Значення pH усіх компонентів, окрім $MgCl_2$, попередньо доводили до 7,0 за допомогою 6N KOH. Після інкубування протягом 30 хвилин при 30 °С реакцію зупиняли додатком 1,5 мл $FeCl_3$-реагенту наступного складу: 10% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ та 3,3% ТХУ в 0,7 N HCl. Денатурований білок видаляли центрифугуванням при 5000 об/хв впродовж 30 хв.

Утворений внаслідок реакції β-гідроксамат L-аспарагінової кислоти визначали по розміру оптичної щільності при 540 нм. Питому активність АК виражали кількістю наномолей β-гідроксамата L-аспарагінової кислоти, що утворювалися за 1 хвилину на 1 мг білку ферментного препарату.

Вміст білка у ферментних препаратах визначали за методом Лоурі, використовуючи альбумін людської сироватки як стандарт [12].

Тип інгібування з'ясовували згідно з [2].

Результати дослідження та їх аналіз

Вплив метионіну, ізолейцину, треоніну та лізину, кінцевих продуктів розгалуженого метаболітного шляху біосинтезу амінокислот аспарагінової родини, на активність АК вивчали у діапазоні концентрацій 2,5—10 мМ (рис. 1). З наведених даних видно, що метионін та ізолейцин не чинили інгібуючого впливу на активність АК у *S. platensis*. В протилежність цьому, треоніну і лізину властива інгібуюча дія на активність АК з вираженим аддитивним ефектом.

Як видно з рис. 1, збільшення вмісту лізину та треоніну в реакційній суміші до 5 мМ призводить до різкого падіння активності АК. Вміст лізину та треоніну вище 5 мМ не викликає подальшого інгібування АК. Така сама залежність інгібуючого впливу від концентрації спостерігалась за сумісного впливу лізину та треоніну на активність АК.

Важливо зазначити, що навіть за насичуючих концентрацій треоніну та лізину повного пригнічення активності АК не спостерігається. Близько 20% активності АК за цих умов завжди виявляється в реакційній суміші. Виходячи з цього, можна передбачити, що АК у *S. platensis* представлена декількома ізоферментами.

У табл. 1 наведені результати аналізу сукупного впливу треоніну та лізину на активність АК. На основі цього аналізу можна зробити висновок, що у *S. platensis* є молекулярна форма АК, схильна до кумулятивного інгібування лізином та треоніном.

Відомо, що активність різних молекулярних форм аспартаткінази у деяких

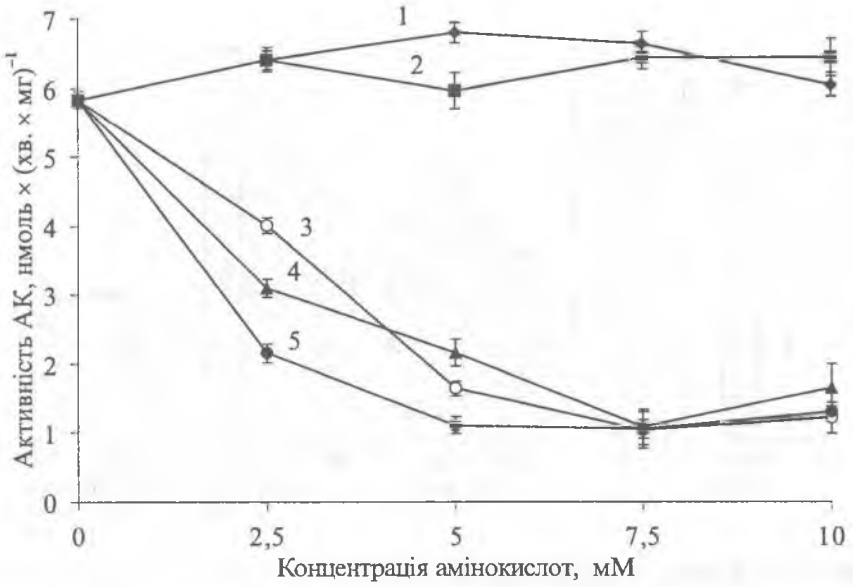

Рис. 1. Залежність активності АК *S. platensis* від вмісту амінокислот аспарагінової родини в реакційній суміші: *1* — метионін, *2* — ізолейцин, *3* — лізин, *4* — треонін, *5* — треонін + лізин

Таблиця 1

Інгібування активності АК у *S. platensis* треоніном і лізіном *in vitro* (n = 8)

Амінокислоти, що додаються до середовища (конц. 2,5 мМ)	Інгібування, %	Залишкова активність (100 % = 1)	
		спостережена в досліді	теоретично розрахована
Треонін	46,9 ± 2,0	0,531	0,531 × 0,687
Лізин	31,3 ± 2,6	0,687	
Суміш цих амінокислот	63,0 ± 2,4	0,370	0,365

мікроорганізмів може інгібуватися одночасно декількома кінцевими продуктами шляхів біосинтезу амінокислот аспарагінової родини [4, 5], і що інгібуюча дія деяких амінокислот може бути значно пом'якшена або й зовсім усунена додатком інших амінокислот [3]. Виходячи з цього, з'ясовували сукупну дію не тільки лізину та треоніну, здатних пригнічувати активність АК, але й сумісний вплив інших амінокислот аспарагінової родини.

Результати цих досліджень наведені на рис. 2, з якого видно, що метионін та ізолейцин як самостійно, так і у суміші не виявляють інгібуючого впливу на активність АК. Питома активність АК за наявності обох амінокислот у середовищі знаходиться на тому ж рівні, що і в присутності одного метионіну, і складає 111% від контролю. Додання метионіну в реакційні суміші з одним треоніном або лізином, а також з сумішшю треоніну та лізину призводить до повного усунення інгібуючої дії лізину та деякого зменшення інгібуючої дії треоніну (на 7%), або суміші треоніну і лізину (на 5%).

Наявність в інкубаційному середовищі ізолейцину разом з лізином або трео-

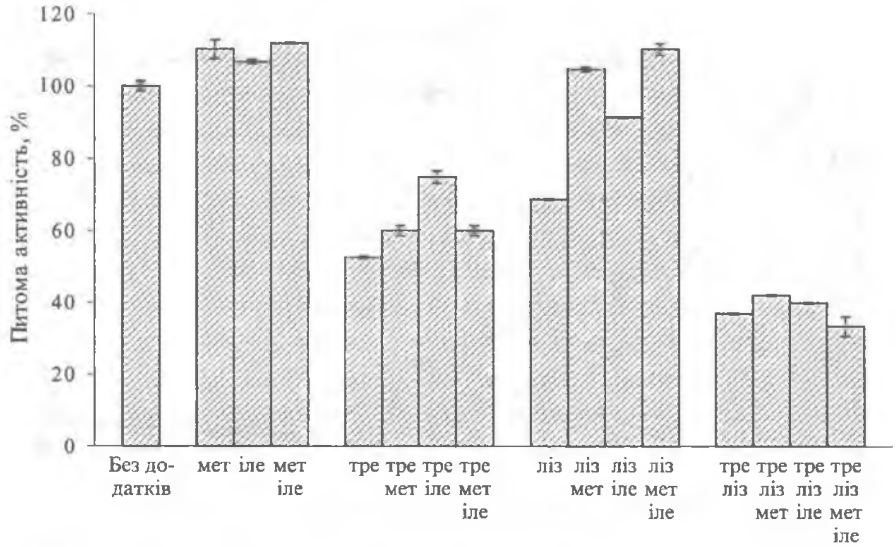

Рис. 2. Питома активність аспартаткінази *S. platensis* за сумісного впливу різних амінокислот аспарагінової родини *in vitro*. Концентрація амінокислот у середовищі — 2,5 мМ

ніном, а також з обома цими амінокислотами призводило до зменшення інгібуючої дії лізину (на 22%) та треоніну (на 14,5%), взятих окремо, але майже не впливало на сумісну інгібуючу дію лізину та треоніну.

Слід відзначити, що в порівнянні з метионіном ізолейцин більш ефективно усував інгібуючу дію треоніну і менш ефективно — лізину.

Добавка суміші метионіну та ізолейцину до середовища, що вже містило треонін або лізин призводило до ефектів, які спостерігались за додатку в такі суміші одного метионіну. Спостережений факт є свідоцтвом на користь того, що метионін має більш високу спорідненість до ферменту, ніж ізолейцин і за сумісного застосування цих амінокислот роль алостеричного ефектора виконує метионін.

Наявність у середовищі суміші метионіну та ізолейцину не призводило до усунення сукупної інгібуючої дії треоніну та лізину. Це ще раз слугує на користь того, що об'єктом інгібуючої дії лізину та треоніну є один і той же ізофермент.

Наявність залишкової активності АК за додатку у реакційну суміш лізину та треоніну у насичуючих концентраціях, спонукало пошук інших інгібіторів АК у *S. platensis*. Відомо, що у деяких мікроорганізмів активність АК може регулюватися не тільки кінцевими, але й проміжними продуктами шляхів біосинтезу амінокислот аспарагінової родини — такими, як гомосерин та мезо-діамінопімелат [4, 5, 13]. В зв'язку з цим ми досліджували вплив гомосерину та мезо-діамінопімелату на активність АК. З наведених у табл. 2 даних видно, що мезо-діамінопімелат у застосованій концентрації не виявляє інгібуючої дії на активність АК, а гомосерин у незначній мірі знижує активність АК (на 7% від контролю). На підставі цього можна припустити, що активність невеликої частки АК у *S. platensis* підлягає регуляції шляхом інгібування гомосерином.

Окремий інтерес викликає факт часткового усунення інгібуючої дії треоніну за наявності в реакційній суміші ізолейцину. Мабуть, в цьому випадку вмикається додатковий механізм регуляції аспартаткіназної активності, який здійснюєть-

Таблиця 2

Вплив гомосерину та мезо-діамінопімелату на активність АК у *S. platensis* ($n = 8$)

Умови досліду	Активність АК	
	Питома активність, нмоль · $хв^{-1} \cdot мг^{-1}$	Відносна активність, %
Без амінокислот (контроль)	5,720 ± 0,0 65	100 ± 1,1
L-гомосерин, 2,5 мМ	5,320 ± 0,0 40 [1]	93,0 ± 0,7
Мезо-диамінопімелат, 2,5 мМ	5,575 ± 0, 228 [2]	97,5 ± 4

Примітка: [1] — відмінность від контролю достовірна; [2] — відмінность від контролю не достовірна.

ся за допомогою інгібування першого ферменту шляху біосинтезу ізолейцину, а саме — треоніндезамінази, кінцевим продуктом цього шляху [9].

Таким чином, можна припустити, що АК у *S. platensis* представлена щонайменше двома ізоферментами, нерівновагими щодо їх внеску у спільну аспартаткіназну активність. Ізофермент, на частку якого припадає до 80% від загальної активності АК, регулюється шляхом кумулятивного інгібування треоніном та лізином. Інший ізофермент підлягає інгібуванню гомосерином.

Таким чином, головним механізмом регулювання активності АК у *S. platensis* є кумулятивне інгібування треоніном та лізином. Окрім цього, в регуляції активності АК у *S. platensis* приймають участь і інші механізми, які здійснюються шляхом інгібування активності АК гомосерином та шляхом ретроінгібування ферментів кінцевими продуктами в окремих шляхах біосинтезу цих продуктів.

Література

1. *Броун И. И.* ODESU — коллекция культур синезеленых водорослей Одесского государственного университета // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР — М., Изд-во РАН. 1991. — С. 205—208.
2. *Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. — М., Мир, 1982. — С. 175—176.
3. *Кара-Мурза С. Н., Ивановская Л. В., Жданова Н. И.* Влияние аминокислот на активность β-аспартаткиназы *Corynebacterium glutamicum* штамма дикого типа и его мутанта // Прикл. биохимия и микробиология. — 1978. — Т. 3, № 14. — С. 345—353.
4. *Лисенко Т. Г., Менджул М. И., Колтукова Н. В., Шаинская О. А., Перепелица С. И.* Выделение, очистка и некоторые свойства аспартаткиназы цианобактерии *Plectonema boryanum* // Укр. биохим. журн. — 1993. — Т. 65, № 1. — С. 54—61.
5. *Лисенко Т. Г., Колтукова Н. В., Кадирова Г. Х., Шаинская О. А.* Аспартаткиназная активность цианобактерии *Anabaena variabilis* // Укр. биохим. журн. — 1993. — Т. 65, № 6. — С. 61—66.
6. *Полодиенко О. Б., Чистосердов А. Ю., Тоцкий В. Н., Циганков Ю. Д.* Влияние аминокислот аспарагинового семейства на активность аспартаткиназы и гомосериндегидрогеназы этионинрезистентных мутантов *Pseudomonas putida* // Микробиол. журн. — 1991. — Т. 53, № 1. — С. 63—67.
7. *Степанович Т. В., Никитин Д. И.* Аспартаткиназная активность и некоторые особенности её регуляции у олиготрофных бактерий // Докл. АН СССР — 1986. — Т. 286, № 1. — С. 213—215.
8. *Шильникова И. И., Зайцева З. М., Тимохина О. А.* Регуляция ферментов биосинтеза и катаболизма гомосерина у аналогорезистентных мутантов *Brevibacterium flavum* // Прикладная биохимия и микробиология. — 1985. — Т. XX1, № 5. — С. 602—609.
9. *Шлегель Г.* Общая микробиология — М.: Мир, 1987. — С. 492.
10. *Blak S., Wright N. G.* β-aspartokinase and β-aspartil phosphate // J. Biol. chem. — 1955. — V. 213. — P. 27—38.

11. *Cohen G. N., Stanier R. Y., Gisele Le Bras.* Regulation of the biosynthesis of amino acids of the aspartate family in Coliform Bacteria and Pseudomonads // Bacteriology. — 1969. — V. 99, № 3. — P. 791—801.
12. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem — 1951. — V. 193. — P. 265—275.
13. *Paulus H.* Regulation and structure of aspartokinase in the genus *Bacillus* // J. Biosci. — 1984. — V.6, № 4. — P. 403.
14. *Zarrouk C.* Contribution a L'etude d'une cyanophycee influence de divers facteurs physigues et chimigues sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler // Thesis presentees a la faculte des sciences de L'unikersite de Paris. — 1966. — 85 p.

Каракис С. Г., Драгоева Е. Г., Лавренюк Т. И., Чабан Ю. Л.
Одесский государственный университет, кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АКТИВНОСТЬ АСПАРТАТКИНАЗЫ *SPIRULINA PLATENSIS* ПОД ВЛИЯНИЕМ АМИНОКИСЛОТ АСПАРАГИНОВОГО СЕМЕЙСТВА

Резюме

Изучено влияние аминокислот аспарагинового семейства на активность аспартаткиназы *Spirulina platensis*. Показано, что 80 % от аспартаткиназной активности ферментного препарата подвергается кумулятивному ингибированию L-лизином и L-треонином. Остаточная активность ингибируется L-гомосерином.

Высказано предположение, что АК у *S. platensis* представлена не меньше, чем двумя изоферментами.

Ключевые слова: аспартаткиназа, активность, регуляция, *Spirulina platensis*

Karakis S. G., Dragoeva E. G., Lavrenjuk T. I., Chaban Y. L.
Odessa State University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE ACTIVITY OF ASPARTATE KINASE FROM *SPIRULINA PLATENSIS* UNDER THE INFLUENCE OF AMINO ACIDS OF THE ASPARAGINE FAMILY

Summary

The effect of asparagine family amino acids on the activity of aspartate kinase of filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* has been studied. It is shown that 80% of the aspartate kinase activity in enzymatic preparation is subject to cumulative inhibition by L-threonine and L-lysine. Remaining aspartate kinase activity is inhibited by L-homoserine. It is supposed that not less than two isoenzymes of aspartate kinase exist in *S. platensis*.

Key words: aspartate kinase, activity, regulation, *Spirulina platensis*