

УДК 579.222:577.150

С. Г. Каракіс, ст. наук. співроб., О. Г. Драгоєва, мол. наук. співроб.,  
Т. І. Лавренюк, мол. наук. співроб., В. А. Сагаріц, наук. співроб.,  
Л. М. Карпов, д-р біол. наук, проф., зав. каф.  
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ МУТАНТНОГО ШТАМУ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS (NORDST.) GEITL.* G27 — НАДПРОДУЦЕНТА С-ФІКОЦІАНІНУ

Здійснено порівняльне вивчення біохімічного складу біомаси, активності глутамінсинтетази та нітритредуктази, а також впливу амінокислот на активність глутамінсинтетази у батьківського штаму дикого типу ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* та його мутантного штаму G27 з надпродукцією с-фікоціаніну. Зроблено припущення, що головною причиною надпродукції с-фікоціаніну у штаму 27G є підвищення глутамінсинтетазної активності та втрата глутамінсинтетазою чутливості до зворотного інгібування амінокислотами.

Ключові слова: *Spirulina*, надпродукція, с-фікоціанін, метаболізм.

С-фікоціанін — це додатковий пігмент фотосинтезу у ціанобактерій та червоних водоростей, який виконує функцію світлозбору та передачі поглинутої енергії світла хлорофілу *a* [1]. Окрім того, у ціанобактерій с-фікоціанін є запасною формою азоту [2]. Структура молекули с-фікоціаніну припускає наявність у ціанобактерій та червоних водоростей координованого синтезу апопротеїнів і білінів, однак, свідоцтв, які б дозволили створити модель такої координації, ще недостатньо [3]. Неабиякий вклад у вивчення процесів синтезу фікобіліпротеїнів та їх регуляції дають мутанти з аномальним пігментним складом.

Раніше ми повідомляли про отримання нами мутантного штаму G27 із *Arthrospira (Spirulina) platensis*, вміст с-фікоціаніну у біомасі котрого перевершував цей показник у батьківського штаму дикого типу у 1,5- 2,9 разів в залежності від умов культивування [4].

Мета цієї роботи — виявити особливості метаболізму мутантного штаму *Arthrospira (Spirulina) platensis* G27, які обумовлюють надпродукцію с-фікоціаніну у порівнянні з батьківським штамом дикого типу.

### Матеріали та методи

В роботі використовували штами ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl.: штам дикого типу (ДТ) та його мутантний штам G27. Штам G27 був отриманий із штаму ДТ шляхом послідовної позитивної селекції на стійкість до аналогу метіоніну — *DL*-етіоніну, *L*-лізину та

аналогу лізину — S-2-аміноетілцистеїну за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу.

Для вирощування культур використовували звичайне середовище Зарука [5] та модифіковане, яке замість нітрату натрію вміщувало еквімолярну кількість нітриту натрію. Вирощування штамів проводили в умовах накопичуваної культури за цілодобового освітлення лампами ЛД-40 та продуванні повітрям. Біомасу штамів для вивчення її біохімічного складу отримували шляхом вирощування культур ціанобактерій при освітленні 6-8 клк, температурі 35 °С. При вивченні залежності вмісту с-фікоціаніну у біомасі від джерела азоту штами вирощували як описано вище, однак, при t-30 °С. Біомасу збирали у стаціонарній фазі росту шляхом фільтрування, промивали 10-кратним об'ємом дистилляту та ліофільно висушували.

При вивченні ферментативної активності штами вирощували при температурі 30 °С та освітленні 2,5-3 клк. Для готування ферментного препарату (ФП) трихоми збирали у пізній логарифмічній фазі росту шляхом фільтрування, промивали на фільтрі 10-кратним об'ємом 50 мМ Тріс-НСІ буфера з домішкою 5 мкМ β-меркаптоетанола та ресуспендували у тому самому буфері у співвідношенні 1:1 по об'єму. Трихоми руйнували УЗ з частотою 22 кГц у продовж 20 хв (по 2 хв з перервою) при температурі 4 °С. Дезинтеграт центрифугували 40 хв при 12 000 обертів/хв. Супернатант використовували для визначення ферментативних активностей.

Глутамінсинтетазну (ГС) активність ферментних препаратів у синтетазній та трансферазній реакціях вивчали як описано у роботі [6]. Нітритредуктазну активність вивчали як описано у роботі [7]. Питому ферментативну активність розраховували як кількість нмоль субстрату, перетвореного ферментом за 1 хв, який міститься в 1 мг білку грубого ферментного препарату. Вміст білка у ФП визначали за методом Лоурі, використовуючи альбумін людської сироватки як стандарт [8].

Вміст білка у біомасі визначали за методом К'ельдаля, вуглеводів — антроновим методом, жирів — за методом Рушковського [9]. Вміст хлорофілу *a* та каротиноїдів у біомасі визначали із екстрактів цих пігментів у 96 % етанолі як описано в [10]. Вміст с-фікоціаніну та алофікоціаніну визначали як описано в [11].

## Результати та їх обговорення

У табл. 1 наведені дані вмісту пігментів у біомасі батьківського та мутантного штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Ці дані свідчать, що при однакових умовах культивування штам G27 накопичує у біомасі у два рази більше фікобіліпротеїнів, ніж штам ДТ.

Відповідно цим даним, штам G27 на відміну від штаму ДТ має підвищений вміст білку та знижений вміст вуглеводів. Цей факт указує на те, що у штаму G27, порівняно зі штамом ДТ, має місце посилення процесів асиміляції неорганічного азоту в органічні азотвміщуючі сполуки. Незалежно від того, у формі яких сполук азот потрапляє в клітини мікроорганізмів,

включення його у органічні сполуки клітин здійснюється у формі  $\text{NH}_4^+$  [12]. З робіт Охмори К. та Охмори М. [13] відомо, що у *Arthrospira (Spirulina) platensis* більша частка  $\text{NH}_4^+$  асимілюється шляхом послідовних реакцій, що каталізуються глутамінсинтетазою (глутамат: аміак лігаза, АДФ, КФ 6.3.1.2.) та глутамінсинтазою (глутамін:  $\beta$ -оксоглутарат — амінотрансфераза, КФ 1.4.7.1); незначна частка  $\text{NH}_4^+$  асимілюється за участю аланіндегідрогенази. Глутаматдегідрогеназа, за даними Охмори К. та Охмори М. [13], участі у асиміляції  $\text{NH}_4^+$  у *Arthrospira (Spirulina) platensis* не приймає. Враховуючи встановлений нами факт, що підвищення вмісту с-фікоціаніну в штаму G27 відбувається на фоні підвищення вмісту протеїнів, а також ключову роль глутамінсинтетази (ГС) у взаємодії азотного та вуглеводного метаболізмів та ключову роль у загальному азотному контролі [12], ми здійснили порівняльне вивчення активності цього ферменту у штамів G27 та ДТ. Результати досліджень представлені у табл. 3. Як видно, активність ГС в клітинах штаму G27 вище, ніж у штаму ДТ в 1,9 разів у синтетазній реакції та в 3,3 рази — у трансферазній реакції.

Таблиця 1  
Вміст пігментів в біомасі штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis*  
(% від сухої ваги)

Штам	С-фікоціанін	Алофікоціанін	Хлорофіл <i>a</i>	Каротиноїди
ДТ	6,3	1,0-1,2	0,9	0,23
27-G	13	2,5	1,0	0,1

В табл.2 наведені результати біохімічного аналізу біомаси штамів.

Таблиця 2  
Біохімічний склад біомаси штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis*  
(% від сухої ваги)

Штам	Протеїн	Ліпіди	Вуглеводи
Дикий тип	60,22 ± 3,84	6,82 ± 1,00	21,93 ± 1,88
G-27	76,50 ± 3,58	9,70 ± 1,51	5,80 ± 2,31

Із даних літератури відомо, що у ціанобактерій активність ГС регулюється через зворотне інгібування амінокислотами та нуклеотидами, а також через внутрішньоклітинний рівень декількох двовалентних катіонів [6,14].

Таблиця 3  
Глутамінсинтетазна та нітритредуктазна активності в клітинах штамів  
*Arthrospira (Spirulina) platensis*

Штам	Активність нітритредуктази нмоль нітриту/ мг білка × хв	Активність глутамінсинтетази	
		Синтетазна реакція нмоль Pi / мг білка × хв	Трансферазна реакція нмоль глутамілгідроксамату / мг білка × хв
ДТ	48,8 ± 1,1	16,2 ± 1,4	9,5 ± 1,4
G27	75,1 ± 2,3	31,2 ± 0,9	31,0 ± 2,3

Тому, маючи на увазі той факт, що штам G27 був отриманий шляхом відбору на стійкість до аналогів метіоніну та лізину — амінокислот аспартатної родини, ми вивчили вплив амінокислот аспартатної родини, а також аланіну, гліцину та серину на активність ГС у штамів G27 та ДТ *in vitro* (рис. 1). Останні три амінокислоти були взяті до експерименту тому, що їх інгібуюча дія на активність ГС із *Arthrospira (Spirulina) platensis* була вже раніше встановлена [16].

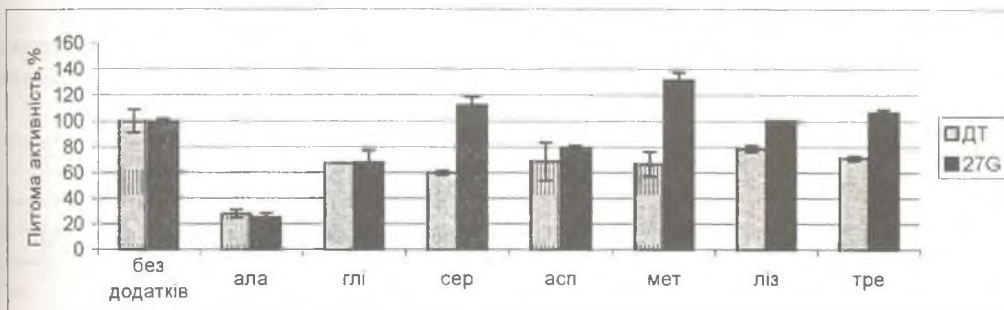


Рис. 1. Питома активність глутамінсинтетази штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis* за впливу амінокислот *in vitro*. Концентрація амінокислот у реакційній суміші — 5 мМ.

Із даних, представлених на рис. 1, видно, що у мутанта G27 активність ГС не інгібуюється серином, метіоніном, лізином та треоніном. Підвищення ГС-активності в клітинах мутанта G27 та втрата чутливості ГС до зворотного ін-гібування амінокислотами призводить до підвищення засвоєння  $\text{NH}_4^+$  та активізації глутамінсинтетаза-глутамінсинтаза (ГС-ГОГАТ) ферментного комплексу в цілому. Як наслідок, має місце інтенсифікація метаболічних процесів, в яких глутамін та глутамат є донорами аміногруп та метаболічних шляхів, котрі починаються від глутамату. Очевидно, ці процеси позитивно впливають на синтез амінокислот і підвищують синтез білків, у тому числі, апопротеїнів с-фікоціаніну.

У ціанобактерій шлях синтезу тетрапіролів, до яких належить с-фікоціанобілін, хромофор с-фікоціаніну, починається від глутамату. Із глутамату у ціанобактерій синтезується універсальний попередник усіх тетрапіролів — 5-амінолевулінова кислота (5-АЛК) [15]. Тому, логічно зробити припущення, що активізація ГС-ГОГАТ шляхів є також причиною надсинтезу с-фікоціанобіліна. Якщо це припущення вірне, то поряд з надсинтезом с-фікоціанобіліна в клітинах мутанта може мати місце надсинтез сірогома, бо синтез сірогома та фікобілінів від 5-АЛК до уропорфіриногена здійснюється по загальному шляху [15]. В умовах підвищеного синтезу амінокислот і сірогему можна очікувати підвищення синтезу нітритредуктази (КФ 1.7.7.1) (НіР). Виходячи з цього, ми здійснили порівняльне вивчення НіР-активності в клітинах штаму G27 та штаму ДТ. Дані, представлені у табл. 3, свідчать що НіР-активність в клітинах штаму G27 у 1,5 рази перевершує такий показник у штаму ДТ. Штам G27, вирощений на нітриті як єдиному джерелі азоту, в умовах, коли активність НіР не лімітується діяльністю

нітратредуктази, має в 1,5 рази більший вміст с-фікоціаніну у біомасі, ніж при вирощуванні на нітраті, як єдиному джерелі азоту (табл. 4). У штаму ДТ вміст с-фікоціаніну не залежав від джерела азоту. Використання нітри-ту замість традиційного чинника азоту нітрату при культивуванні штаму G27, дозволяє підвищити вміст с-фікоціаніну у його біомасі через модифікацію середовища росту. Можливо, підвищення НіР-активності в клітинах мута-нта G27 є наслідком підвищення рівня ГС-активності як результат надсин-тезу білкової продукції та сірогему.

Таблиця 4

Вміст с-фікоціаніну та вихід біомаси у штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis* в залежності від джерела азоту

Джерело азоту, 30 мМ	Вміст с-фікоціаніну, % від сухої біомаси		Вихід біомаси, г/л	
	ДТ	G27	ДТ	G27
Нітрат натрію	11,32 ± 0,94	18,06 ± 1,99	1,72 ± 0,11	1,91 ± 0,09
Нітрит натрію	11,71 ± 0,94	28,48 ± 1,80	1,71 ± 0,13	2,10 ± 0,09

Таким чином, генетично детерміноване підвищення глутамінсинтеза-ної активності та порушення механізмів ретроінгібування ГС, вірогідно, є одними із головних причин надпродукції с-фікоціаніну у мутанта G27. Можливо, координація синтезу апопротеїнів с-фікоціаніну та фікобілінів у ціанобактерій здійснюється на рівні ГС-ГОГАТ ферментного комплексу.

## Література

1. Бекасова О. Д., Евстигнеев В. Б., Шубин Л. М. О взаимодействии фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла в клетках *Aphanizomenon flos-aque* // Известия академии наук СССР. — Серия биологическая. — 1974. — № 2. — С. 241-249.
2. Boussiba S., Richmond A. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green algae *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. — 1980. — V. 125. — P. 143.
3. Yoshihiko Fujita. Flexibility of energy conversion process in thylakoids of cyanobacteria // Journal of Scientific & Industrial Research. — 1996. — V. 55. — P. 618-629.
4. Karakis S. G., Brown I. I. C-phycocyanin producing G-27 strain of *Spirulina platensis* // Third European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. Sevilla (Spain). — 1995. — P. 57.
5. Zarrouk C. Contribution a l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler // Ph. D. Thesis, University of Paris. — 1966. — P. 85.
6. Данг Хоанг Фьюк Хьен, Соловьева Н. А., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л. Специфичность и регуляция активности глутаминсинтезазы *Spirulina platensis* металлами // Доклады академии наук СССР. — 1988. — Т. 302, № 4. — С. 984-987.
7. Yabuki Y., Mori E., Tamura G. Nitrit reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis* // Agric. Biol. Chem. — 1985. — V. 49. — P. 3061-3062.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall B. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, № 1. — P. 871-876.
9. Методы биохимического исследования растений // Под ред. А. И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 200-201.
10. Litchenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1987. — V. 148. — P. 350-381.

11. Tandeau de Marsac N. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1988. — V. 167. — P. 318-328.
12. Magazanik B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria // Ann. Rev. Genet. — 1982. — V. 16. — P. 135-168.
13. Ohmori K., Ohmori M. Ammonium assimilation in the blue green alga *Spirulina platensis* / Jpn. J. Phycol. — 1988. — V. 36. — P. 12-16.
14. Данг Хоанг Фьюк Хьен, Соловьева Н. А., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л. Регуляция активности глутаминсинтетазы *Spirulina platensis* // Биохимия. — 1989. — Т. 54, вып. 2. — С. 292-298.
15. Стадничук И. Н. Фикобилипротеины // Биологическая химия (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). — 1990. — Т. 40. — С. 1-196.

**С. Г. Каракис, Е. Г. Драгоева, Т. И. Лавренюк, В. А. Сагарци,  
Л. М. Карпов**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА МУТАНТНОГО ШТАММА  
ARTHROSPIRA (SPIRILINA) PLATENSIS (NORDST.) GEITL.  
G27 — СВЕРХПРОДУЦЕНТА С-ФИКОЦИАНИНА**

**Резюме**

Проведено сравнительное изучение биохимического состава биомассы, активностей глутаминсинтетазы и нитритредуктазы, а также влияния аминокислот на активность глутаминсинтетазы у штамма дикого типа *Arthrospira (Spirulina) platensis* и его мутантного штамма G27, обладающего сверхпродукцией с-фикоцианина. Сделано предположение, что основной причиной сверхпродукции с-фикоцианина у штамма G27 является повышенная активность глутаминсинтетазы и потеря глутаминсинтетазой чувствительности к обратному ингибированию аминокислотами.

**Ключевые слова:** *Spirulina*, сверхпродукция, с-фикоцианин, метаболизм.

**S. G. Karakis, E. G. Dragoeva, T. I. Lavrenjuk, V. A. Sagaric,  
L. M. Karpov**

Odessa National I. I. Mechnikov University,  
Dvoryanskaya St. 2, Odessa, 65026, Ukraine

**METABOLISM PECULIARITIES OF *ARTHROSPIRA (SPIRULINA)*  
*PLATENSIS* MUTANT STRAIN G27 — THE C-PHYCOCYANIN  
OVERPRODUCER**

**Summary**

Biochemical biomass composition, glutamine synthetase and nitrite reductase activities, as well as the effect of amino acids on the activity of glutamine synthetase have been studied in *Arthrospira (Spirulina) platensis* wild strain and c-phycoerythrin overproducing mutant strain G27. It was suggested that the increase of glutamine synthetase activity and the decrease of glutamine synthetase sensitivity to feedback inhibition by amino acids are the main causes for c-phycoerythrin overproduction in mutant G27.

**Key words:** *Spirulina*, overproduction, c-phycoerythrin, metabolism.