

**С.Г. Каракіс**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 32,  
e-mail: karakis\_sg@mail.ru

## **ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ АМІНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОСТІ АСПАРТАТКІНАЗИ ТА ГОМОСЕРИНДЕГІДРОГЕНАЗИ У МУТАНТНИХ ШТАМІВ *SPIRULINA PLATENSIS* З НАДСИНТЕЗОМ МЕТІОНІНУ**

*Ферментативну активність аспартаткінази (АК) та гомосериндегідрогенази (ГСДГ) визначено в клітинах батьківського штаму дикого типу (ДТ) ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* та його етіонінрезистентних мутантів 30Б та 198Б, отриманих у ході селекції штамів з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі. Встановлено підвищений рівень АК-активності у порівнянні зі штамом ДТ у штаму 198Б (в 1,8 рази). АК усіх штамів підлягає кумулятивному інгібуванню лізином та треоніном. У штаму 198Б інгібувальна дія цих амінокислот значно менша, ніж у штаму ДТ. За рівнем ГСДГ-активності значної різниці між штамми не встановлено. Виявлено, що ГСДГ усіх штамів підлягає інгібуванню треоніном, однак різною мірою. У штаму ДТ треонін у концентрації 5 мМ пригнічує активність ГСДГ повністю, у штаму 30Б – на 53%, у штаму 198Б – на 21%. У штамів ДТ і 30Б ГСДГ активується ізольцином на 32 та 14%, відповідно. У штаму 198Б ГСДГ втрачає здатність до активації ізольцином, але набуває підвищеної здатності (на 33%) до активації метіоніном.*

*К л ю ч о в і с л о в а : *Spirulina platensis*, синтез метіоніну, аспартаткіназа, гомосериндегідрогеназа, регуляція.*

Ціанобактерії вважаються перспективними об'єктами фотоавтотрофних біотехнологій [1]. Однак, у даний час, незважаючи на зусилля вчених, серед ціанобактерій не селекціоновано промислово-перспективних штамів-продуцентів вільних амінокислот. Тому вивчення особливостей метаболізму мутантів ціанобактерій, здатних до надсинтезу амінокислот, дуже важливе як для розуміння особливостей метаболізму ціанобактерій та механізмів його контролю, так і для селекції згаданих штамів-продуцентів.

Раніше нами опубліковано дані про селекцію мутантних штамів ціанобактерії *Spirulina platensis*, стійких до *DL*-етіоніну – аналогу метіоніну, які були здатні до надсинтезу метіоніну та накопичували його в біомасі [2, 3]. Враховуючи той факт, що у багатьох промислових штамів-продуцентів вільних амінокислот надпродукція обумовлена генетично-детермінованими порушеннями регуляції ключових ферментів в шляхах біосинтезу цих амінокислот [4, 5], важливо провести порівняльне дослідження активностей ключових ферментів та деяких моментів їх регуляції в



шляхах біосинтезу амінокислот аспарагінової родини, до якої належить і метіонін, у отриманих нами штамів, здатних до надсинтезу метіоніну, та у їх батьківського штаму дикого типу.

Аспартаткіназа (АТФ:  $\alpha$ -аспартат-4-фосфотрансфераза, КФ 2.7.2.4., далі АК), та гомосериндегідрогеназа (L-гомосерин: НАДФ<sup>+</sup>оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.3., далі ГСДГ) є важливими ключовими ферментами розгалуженого шляху біосинтезу амінокислот аспарагінової родини у мікроорганізмів, активність яких регулюється кінцевими продуктами цього шляху [7, 8]. Як було показано нами раніше, у ціанобактерії *S. platensis* 80% загальної АК-активності ферментного препарату підлягає кумулятивному інгібуванню L-треоніном та L-лізином. Решта АК-активності інгібується також L-гомосерином [6]. Даних про участь амінокислот аспарагінової родини в регуляції активності ГСДГ у *S. platensis* в доступній літературі виявити не вдалося.

Мета даної роботи — вивчити вплив амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ батьківського штаму дикого типу ціанобактерії *S. platensis* та його етіонінрезистентних мутантів 30Б та 198Б, отриманих на різних стадіях селекції штамів з надсинтезом метіоніну *in vitro*.

### Матеріали та методи

В роботі використовували штами ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl.: штам дикого типу (ДТ), та мутантні штами, отримані нами в ході селекції штамів з надсинтезом метіоніну у біомасі — проміжний штам 30Б, у котрого вміст метіоніну у біомасі на 27% вищий ніж у штаму ДТ, та штам 198Б, отриманий на останній стадії селекції, у якого вміст метіоніну у біомасі у 2,2 рази вищий ніж у штаму ДТ [2, 3].

Біомасу штамів вирощували та готували для дослідження, як описано в [6]. Для визначення ферментативних активностей в роботі використовували частково очищений ферментний препарат (безклітинний екстракт, висолений сульфатом амонію), який готували за методом [9].

Аспартаткіназну активність визначали методом Блека з деякими модифікаціями [11]. Стандартна реакційна суміш містила такі концентрації компонентів (об'єм 1 мл): 100 мМ калій-фосфатного буфера, рН 7,0; 100 мМ L-аспарагінової кислоти; 20 мМ АТФ; 20 мМ MgCl<sub>2</sub>; 400 мМ гідроксиламіну; ферментний препарат (білок 3–5 мг/мл). Значення рН усіх компонентів, окрім MgCl<sub>2</sub>, попередньо доводили до 7,0 за допомоги 6 N КОН. Після інкубування протягом 30 хвилин при 30 °С реакцію зупиняли додаванням 1,5 мл реагенту такого складу: 10% FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O та 3,3% ТХУ в 0,7 N HCl. Денатурований білок вилучали центрифугуванням при 5000 об/хв впродовж 30 хв. Утворений внаслідок реакції  $\beta$ -гідроксамат L-аспарагінової кислоти визначали спектрофотометрично при 540 нм. АК-активність виражали кількістю наномолей  $\beta$ -гідроксамата L-аспарагінової кислоти, що утворювався за 1 хвилину на 1 мг білка ферментного препарату.

Гомосериндегідрогеназну активність визначали з використанням біохімічної реакції, що відбувалася у напрямку: гомосерин + НАДФ<sup>+</sup> = напівальдегід аспарагінової кислоти + НАДФН, та аналізували за швидкістю відновлення НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм [13]. Тривалість реакції 5 хв. Стандартна реакційна суміш була такого складу (об'єм 3 мл): 10 мМ трис-HCl буфер, рН 9,0; 400 мМ KCl; 0,27 мМ НАДФ<sup>+</sup>; 1,7 мМ гомосерину та ферментний препарат (білок 3–5 мг/мл). Розчин



гомосерину попередньо доводили до рН 9,0 за допомоги 4 N КОН. ГСДГ-активність виражали кількістю наномоль НАДФН, що утворювався за 1 хвилину на 1 мг білка ферментного препарату.

Вплив амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ вивчали *in vitro* шляхом додавання їх у концентрації 5 мМ до реакційної суміші для визначення активностей цих ферментів. Як було встановлено нами в попередніх дослідженнях, ця концентрація є насичувальною для амінокислот аспарагінової родини, які впливали на активність АК [6] та ГСДГ (не опубліковані дані) у *S. platensis*.

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

Експерименти повторювали шестикратно. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програм MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомоги *t*-критерію Стьюдента.

### Результати дослідження та їх обговорення

Враховуючи сучасні знання про шляхи біосинтезу амінокислот аспарагінової родини та їх регуляцію [7, 8], а також особливості метаболізму отриманих селекційно-генетичними та генно-інженерними методами штамів-продуцентів амінокислот цієї родини у різних мікроорганізмів [5, 9], нами було зроблене припущення, що у штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis*, здатних до надсинтезу метіоніну, має місце порушення регуляції активності ключових ферментів аспартаткінази та гомосериндегідрогенази.

В табл. 1 наведені результати визначення аспартаткіназної та гомосериндегідрогеназної активностей в клітинах підослідних штамів. У проміжного мутанта 30Б АК-активність не перевищує аналогічний показник у штама ДТ. На відміну від нього, АК-активність у мутанта 198Б в 1,8 раза є вищою, ніж у штама ДТ. Гомосериндегідрогеназна активність у вивчених штамів суттєво не відрізняється.

Таблиця 1  
Аспартаткіназна та гомосериндегідрогеназна активності в клітинах штамів *Spirulina platensis* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Table 1  
Aspartate kinase and homoserine dehydrogenase activities in cells of *Spirulina platensis* strains ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Штам	Аспартаткіназна активність		Гомосериндегідрогеназна активність	
	мкмоль β-гідроксамату L-аспарагінової кислоти/ хв на мг білка	%	нмоль НАДФН/ хв на мг білка	%
ДТ	6,15±0,17	100,0±2,7	1,67±0,06	100,0±3,2
30Б	6,18±0,12	100,4±2,0	1,90±0,06*	114,1±3,8*
198Б	10,95±0,34*	178,1±5,5*	1,63±0,02	97,9±1,4

\* різниця вірогідна у порівнянні з ДТ ( $p \leq 0,05$ )



Враховуючи той факт, що в регуляції активностей АК та ГСДГ у мікроорганізмів беруть участь кінцеві продукти шляхів біосинтезу амінокислот аспарагінової родини [7–9], а також те, що у піддослідних мутантних штамів 30Б та 198Б має місце значне підвищення внутрішньоклітинного пулу вільних амінокислот у порівнянні з батьківським штамом ДТ [2], вивчали вплив амінокислот аспарагінової родини на активність вищезгаданих ферментів із штамів 30Б, 198Б та дикого типу *in vitro*. Результати дослідження активності АК із різних штамів за впливу амінокислот аспарагінової родини надані у табл. 2. Ці дані підтвердили встановлений нами раніше факт [6], що лізину та треоніну властива інгібувальна дія на активність АК із штаму ДТ з вираженим адитивним ефектом. Метіонін та ізолейцин не інгібують активність АК із ДТ.

Згідно з даними, наведеними у табл. 2, АК із проміжного штаму 30Б суттєво не відрізняється від АК із штаму ДТ за дією амінокислот аспарагінової родини на її активність. На відміну від цього, АК із штаму 198Б частково втрачає здатність до зворотного інгібування лізином та треоніном — вона майже у 2 рази слабше інгібується лізином та треоніном, ніж АК із штамів попередників. Окрім того, АК із штаму 198Б набуває здатності активуватися ізолейцином. У присутності цієї амінокислоти активність АК підвищується на 58% у порівнянні з контролем, у той час, як активність АК із штаму ДТ та штаму 30Б не зазнає змін під впливом ізолейцину. За дією метіоніну на активність АК штам 198Б не відрізняється від вихідних штамів.

Таблиця 2

**Вплив амінокислот на активність аспартаткінази із різних штамів *Spirulina platensis* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Table 2

**Effect of amino acids on activity of aspartate kinase from different strains of *Spirulina platensis* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Амінокислота (5 мМ)	Активність аспартаткінази (% від контролю)		
	Штам ДТ	Штам 30Б	Штам 198Б
Контроль (без додатків)	100,0 $\pm$ 2,7	100,0 $\pm$ 2,0	100,0 $\pm$ 3,1
met	105,2 $\pm$ 2,5	91,6 $\pm$ 2,1*	108,2 $\pm$ 3,4*
lys	30,0 $\pm$ 0,9*	35,4 $\pm$ 1,0*	79,5 $\pm$ 2,8*
thr	40,0 $\pm$ 0,7*	37,5 $\pm$ 1,0*	79,0 $\pm$ 2,7*
ile	102,8 $\pm$ 2,8	98,8 $\pm$ 2,4	157,9 $\pm$ 5,8*
lys+thr	24,3 $\pm$ 0,7*	31,3 $\pm$ 1,0*	50,0 $\pm$ 1,4*

\* різниця вірогідна у порівнянні з контролем ( $p \leq 0,05$ )

В табл. 3 наведено результати порівняльного вивчення активності ГСДГ із різних штамів за впливом амінокислот, які синтезуються за її участю. Наведені



дані свідчать, що у штаму ДТ активність ГСДГ інгібується треоніном (при концентрації 5 мМ — повністю) і дещо активується ізолейцином — на 32%. У проміжного штаму 30Б має місце часткова втрата здатності ГСДГ до зворотнього інгібування її активності треоніном та активації ізолейцином. У присутності треоніну активність ГСДГ із штаму 30Б інгібується тільки на 53,3%, а у присутності ізолейцину — активується тільки на 14%. ГСДГ із штаму 198Б ще менш чутлива до дії треоніну та ізолейцину, ніж із штаму 30Б. В концентрації 5 мМ треонін пригнічує активність ГСДГ штаму 198Б лише на 20%, а ізолейцин майже не впливає на її активність.

Таблиця 3

**Вплив амінокислот на активність гомосериндегідрогенази із різних штамів *Spirulina platensis* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Table 3

**Effect of amino acids on activity of homoserine dehydrogenase from different strains of *Spirulina platensis* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Амінокислота (5 мМ)	Активність (% від контролю)		
	Штам ДТ	Штам 30Б	Штам 198Б
Контроль (без додатків)	100,0 $\pm$ 3,2	100,0 $\pm$ 3,8	10,0 $\pm$ 2,4
met	107,1 $\pm$ 1,4*	110,0 $\pm$ 3,1*	133,3 $\pm$ 0,1*
thr	0*	46,7 $\pm$ 0,2*	79,0 $\pm$ 2,7*
ile	132,1 $\pm$ 1,5*	114,1 $\pm$ 1,3*	104,7 $\pm$ 2,5

\* різниця вірогідна у порівнянні з контролем ( $p \leq 0,05$ )

Отже, мутант 30Б відрізняється від батьківського штаму ДТ значною мірою лише втратою здатності ГСДГ до зворотного інгібування треоніном. Ці зміни в метаболізмі обумовлюють незначне підвищення синтезу метіоніну у цього штаму — всього на 27%. На відміну від штаму 30Б, штам 198Б характеризується значним підвищенням АК-активності та частковою втратою здатності АК до зворотного інгібування лізином та треоніном. Окрім того, у штаму 198Б ГСДГ ще більш значною мірою втрачає здатність до інгібування треоніном та активації ізолейцином та набуває здатності до активації метіоніном. Вочевидь, ці генетично-детерміновані особливості штаму 198Б дозволяють посилити потік метаболітів-попередників у індивідуальні шляхи синтезу метіоніну та обумовлюють його надсинтез (вміст метіоніну в його біомасі в 2,2 раза вищий, ніж у ДТ).

Таким чином, на основі порівняння рівнів АК- та ГСДГ-активностей та особливостей впливу амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ у підслідних штамів, можна зробити висновок, що значне підвищення синтезу метіоніну у спіруліні потребує одночасного послаблення негативного контролю активності як АК, так і ГСДГ кінцевими продуктами на фоні значного підвищення АК-активності.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Шестаков С.В. Перспективы использования фототрофных бактерий в биотехнологии // В кн.: Биотехнология, М.: Наука, 1984. — С. 212–215.
2. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагаріц В.А., Карнов Л.М. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10, в. 3. — С. 55–62.
3. Каракіс С.Г., Карнов Л.М., Драгоева Е.Г., Лавренюк Т.И., Сагаріц В.А., Марченко В.С. Биохимический состав биомассы штаммов *Arthrospira (Spirulina) platensis* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 58–62.
4. Жданова Н.И. Мутационные нарушения регуляции биосинтеза как основа селекции штаммов микроорганизмов, продуцирующих аминокислоты: Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. — М., 1980. — 50 с.
5. Park S.D., Lee J.Y., Sim S.Y., Kim Y., Lee H.S. Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain // Metab. Eng. — 2007. — 9(4). — P. 327–336.
6. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Чабан Ю.Л. Активність аспартаткінази *Spirulina platensis* за впливу амінокислот аспарагінової родини // Вісник ОДУ. — 2000. — Т. 5, в. 1. — С. 13–18.
7. Cahyanto M.N., Kawasaki H., Nagashio M., Fujiyama K., Seki T. Regulation of aspartokinase, aspartate dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase in *Lactobacillus plantarum* // Microbiology. — 2006. — 152(Pt 1). — P. 105–112.
8. Eikmanns B.J., Eggeling L., Sahm H. Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* // Antonie Van Leeuwenhoek. — 1993–1994. — 64, № 2. — P. 145–163.
9. 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. XXI, № 5. — С. 602–609.
10. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycie influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (setch et Gardner) Geitler — in : Thesis présentées a la faculté des sciences de l'université de Paris — 1966. — 85 p.
11. Blak S., Wright N.G.  $\beta$ -aspartokinase and  $\beta$ -aspartil phosphate // J. Biol. Chem. — 1955. — V. 213. — P. 27–38.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193. — P. 265–275.
13. Miyajima R., Otsuka S., Shiio A. regulation of aspartate famili amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. 1. Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis // J. Biochem. — 1968. — 63, № 2. — P. 139–148.

С.Г. Каракіс

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis\_sg@mail.ru

**ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АМИНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОСТИ  
АСПАРТАТКИНАЗЫ И ГОМОСЕРИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
У МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *SPIRULINA PLATENSIS*,  
ОБЛАДАЮЩИХ СВЕРХСИНТЕЗОМ МЕТИОНИНА**

## Реферат

Ферментативная активность аспартаткиназы (АК) и гомосериндегидрогеназы (ГСДГ) были определены в клетках родительского штамма дикого типа (ДТ)



цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* и его этионинрезистентных мутантных штаммов 30Б и 198Б, полученных на разных этапах селекции штаммов с повышенным содержанием метионина в биомассе. Установлено, что только мутант 198Б имеет повышенный уровень АК-активности (в 1,8 раза) по сравнению со штаммом ДТ. АК всех штаммов коммулятивно ингибируется лизином и треонином. Однако, только у штамма 198Б ингибирующий эффект этих аминокислот намного меньше, чем у штамма ДТ. Существенной разницы в уровне ГСДГ-активности у изученных штаммов не выявлено. Показано, что ГСДГ всех штаммов ингибируется треонином. В концентрации 5 мМ треонин ингибирует ГСДГ штамма ДТ полностью, штамма 30Б — на 53%, штамма 198Б — на 21%. У штаммов ДТ и 30Б ГСДГ активируется изолейцином на 32 и 14%, соответственно. У штамма 198Б ГСДГ не активируется изолейцином, однако повышается способность к активации метионином на 33%.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Spirulina platensis*, синтез метионина, аспартаткиназа, гомосериндегидрогеназа, регуляция.

S.G. Karakis

Odesa National of Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis\_sg@mail.ru

## PECULIARITIES OF ASPARTATE KINASE AND HOMOSERINE DEHYDROGENASE ACTIVITIES REGULATION BY AMINO ACIDS IN *SPIRULINA PLATENSIS* MUTANT STRAINS WITH METHIONINE SUPER SYNTHESIS

### Summary

The activities of aspartate kinase (AK) and homoserine dehydrogenase (GSDG) have been determined in cells of parental wild strain as well as 30B and 198B mutant strains, received on different stages of *Spirulina platensis* strain selection with elevated content of methionine in biomass. It was found, that only strain 198B showed considerable increase of AK activity (in 1.8 times) in respect to the wild strain. AK-activity is subject to cumulative inhibition by L-threonine and L-lysine in all strains. However, in mutant 198B inhibition effect of these amino acids on the activity AK is much smaller than the same in the wild strain. There is no essential difference in value of GSDG-activity between investigated strains. It is established, that GSDG-activity is subject to inhibition by L-threonine in all strains. GSDG from wild strain was completely inhibited by L-threonine (5 mM), from 30B strain — on 53%, from 198B strain — only on 21%. GSDG from wild strain and 30B strain was activated by L-isoleucine on 32 and 14%, according. GSDG of 198B mutant was not activated by L-isoleucine, but its had a high stimulatory effect (33%) by L-methionine.

Key words: *Spirulina platensis*, methionine synthesis, aspartate kinase, homoserine dehydrogenase, regulation.

