

Профессор В.С. Григоров, аспирантка Д.Е. Стрельникова
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра микробиологии и биохимии, тел (473) 255-55-57

Уровень АТФ и активность глюкоамилазы в клетках микромицетов, культивируемых при различных температурах

Изучено влияния температуры на изменение уровня АТФ в клетках термотолерантного и мезофильного микромицетов в процессе биосинтеза глюкоамилазы.

The influence of temperature on the level of ATP in the cells of thermotolerance and mesophilic micromycetes in the biosynthesis of glucoamylase was studied.

Ключевые слова: глюкоамилаза, микромицеты, мицелий, изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутарат, глутаматдегидрогеназа.

Энергетический обмен клетки в процессе биосинтеза ферментов осуществляется за счет превращений, протекающих в системе АТФ-АДП. Уровень АТФ в клетках варьирует в зависимости от температуры культивирования микроорганизмов [1].

В работе рассмотрены некоторые метаболические процессы термотолерантного (*R. rugosa* P₁) и мезофильного (*A. awamori*) штаммов – продуцентов глюкоамилазы, культивируемых при температурах 30, 40 и 45° С в колбах 750 см³ глубинным способом с частотой вращения 4 сек⁻¹ в течение 72 ч. Для культивирования продуцентов использовались сбалансированные по химическому составу питательные среды в соответствии с физиологическими потребностями микромицетов [2, 3]. Через каждые 24 ч. определялась глюкоамилазная активность (ГЛА) глюкозооксидазным методом [4] и содержание АТФ в мицелии микромицетов люцеферин-люцеферазным методом Стрелера и Хендли в модификации Позмоговой и Мальянца [1], основанным на регистрации хемилюминесценции, возникшей в результате реакции люцеферин-люцеферазы с АТФ разрушенных кипячением в течение 10 мин клеток.

При каждом определении количества АТФ в опытной пробе использовались 3 контроля: в двух контролях использовался эталонный раствор АТФ и в одном – эталонный раствор АТФ добавлялся в колбу с уже замеренным количеством АТФ. В связи с этим замерялось общее количество АТФ. Эталонный раствор АТФ, приготовленный перед употреблением, служил для учета потерь биолюминесценции из-за светорассеивающих

элементов, находящихся в пробе. Записи сигналов при анализе опытного и эталонного растворов АТФ приведены на рисунке 1.

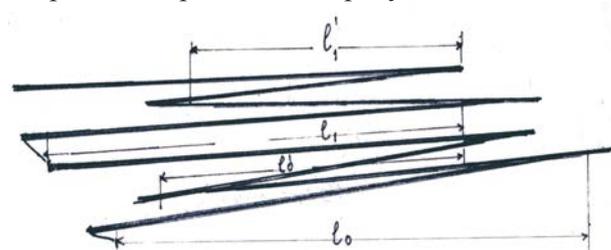


Рисунок 1 - Запись сигналов: l_0 – сигнал эталонного раствора АТФ, мм (1 повторность); l_0' – сигнал эталонного раствора АТФ (2 повторность), мм; l_1 – сигнал АТФ опытного образца, мм; l_1' – сигнал после получения l_1 и добавления к опыту (с известным количеством АТФ) x эталонного раствора АТФ, мм.

Подсчет результатов анализов проводился по формуле:

$$Y = \frac{l_1 l_0'}{l_0 l_1'} \cdot x \cdot M \cdot 10^{-8}, \quad (1)$$

где: l_0 – сигнал (мм) эталонного раствора АТФ (1-я проба); l_0' – сигнал эталонного раствора АТФ (2-я повторность); l_1 – сигнал АТФ опытного образца; l_1' – сигнал после получения l_1 и добавления к опыту (с известным количеством АТФ) x эталонного раствора АТФ; $x \cdot M \cdot 10^{-8}$ – концентрация эталонного раствора АТФ; Y – количество АТФ в сухой биомассе мицелия, н·М/мг.

Количество АТФ пересчитывалось на 1 мг сухой биомассы. Средняя арифметическая погрешность определения составляла $\pm 7,5$ %. Динамика роста микромицетов, содержание

АТР и активность глюкоамилазы в мицелии и культуральной жидкости продуцентов при различных температурах культивирования показаны в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Содержание АТР в мицелии микромицетов, синтезирующих Гл.А при различных температурах

t, °C	τ, ч	АТР, Н*моль/мг сухой биомассы	Биомасса г/100 см ³	Активность глюкоамилазы	
				Мицелии, ед/г	Культуральные жидкости, ед/100 см ³
<i>Rhizopus pygmaeus</i> P ₁					
30	24	5,65	1,4	17,8	1857
	48	5,03	1,7	18,5	1921
	72	3,55	0,9	13,0	1990
40	24	5,97	1,2	16,7	2082
	48	5,34	1,5	18,1	2283
	72	4,0	0,7	10,2	2300
45	24	6,17	1,0	12,3	1562
	48	5,41	1,2	16,8	1787
	72	4,02	1,5	7,8	1559
<i>Aspergillus awamori</i>					
30	24	4,57	1,3	11,3	1277
	48	4,12	1,5	8,0	1910
	72	3,12	0,8	6,2	1970
40	24	4,88	0,7	4,3	421
	48	4,33	0,6	2,1	410
	72	3,67	0,4	2,0	130
45	24	-	0,2	0,08	0,0
	48	-	-	-	-
	72	-	-	-	-

Как показывают данные таблицы 1, увеличение температуры культивирования с 30 до 45 °C у термотолеранта и до 40 °C у мезофила к 24-48 ч. приводит к увеличению содержания АТР при одновременном снижении количества образующейся биомассы и активности глюкоамилазы в мицелии. Активность фермента в культуральной жидкости при 30 °C для термотолеранта к 48 ч. возрастает незначительно. При 40 °C значительное возрастание активности происходит в течение всего периода культивирования; при 45 °C глюкоамилазная активность снижается только после 48 ч.

Для мезофильного штамма ферментативная активность возрастает только при 30 °C. Дальнейшее повышение температуры приводит к инаktivации глюкоамилазы и при температуре 45 °C к 48 ч. роста мицелий превращается в шариковидные формы, рост практически прекращается, в культуральной жидкости актив-

ность фермента не обнаруживается.

Для определения оптимальных параметров процесса экспериментальные данные обрабатывались по программе множественной корреляции.

Полученные математические зависимости от температуры (x₁) и времени (x₂) адекватно описывают уровень содержания АТР, Н*моль/мг – (y₁), количество биомассы, г/100 см³ – (y₂), активность глюкоамилазы в мицелии, ед/ч – (Y₃) и в культуральной жидкости, ед/100 см³ – (Y₄):

- для термотолерантного микромицета:

$$y_1 = 3,11 + 0,17x_1 - 0,03x_2 - 0,00006x_1x_2 - 0,002x_1^2 + 0,00005x_2^2, \quad (2)$$

$$y_2 = 0,16 + 0,043x_2 + 0,00005x_1x_2 - 0,0007x_1^2 - 0,0004x_2^2, \quad (3)$$

$$Y_3 = -32,38 + 2,31x_1 + 0,41x_2 - 0,002x_1x_2 - 0,03x_1^2 - 0,003x_2^2, \quad (4)$$

$$Y_4 = -9227,76 + 584,2x_1 + 14,21x_2 + 0,1x_1x_2 - 7,6x_1^2 - 0,13x_2^2, \quad (5)$$

- для мезофила:

$$y_1 = 5,98 - 0,039x_1 - 0,034x_2 + 0,000x_1x_2 + 0,0005x_1^2 + 0,00005x_2^2, \quad (6)$$

$$y_2 = 0,77 - 0x_1 + 0,004x_2 + 0,0003x_1x_2 + 0x_1 - 0,0002x_2^2, \quad (7)$$

$$Y_3 = 10,4 - 0,00001x_1 - 0,2x_2 + 0,0014x_1x_2 + 0x_1^2 + 0,0007x_2^2, \quad (8)$$

$$Y_4 = -2695,93 + 224,03x_1 + 4,65x_2 - 1,9x_1x_2 - 1,79x_1^2 + 0,44x_2^2. \quad (9)$$

Эти данные указывают на существенные отличия термотолерантного штамма от мезофильного.

Исследования показали, что различные температуры культивирования изменяют не только уровень АТР в клетках, но и оказывают влияние на интенсивность функционирования некоторых ферментов цикла Кребса.

Так изоцитратдегидрогеназная (ИЦДГ) активность, определенная при повышении температуры с 30 до 45 °C у *Rh. Pygmaeus* P₁ мало изменяется и составляет 0,96-0,98 мкМ субстрата мин/мг белка. Это дает возможность изоцитратдегидрогеназе при участии NAD-P активно катализировать превращение изоцитрата в α-кетоглутарат.

У *A. awamori* изоцитратдегидрогеназа не устойчива к повышению температуры. Ее активность снижается уже при 40 °С и составляет 0,75 мкМ субстрата/мг белка.

Однако у микромицетов при этом снижается глутаматдегидрогеназная активность. Это приводит к снижению образования глутаминовой кислоты из α-кетоглутарата и к уменьшению образующейся биомассы и активности глюкоамилазы; к увеличению содержания АТР в мицелии, расход которой на процессы синтеза белка фермента и биомассы замедляется (таблица 1).

В подтверждение данных предположений были проведены исследования по определению количества α-кетоглутарата в культуральной жидкости калориметрическим методом с 2,4 – динитрофенолгидрозином [6], активности NAD и NAD-P – зависимой глутаматдегидрогеназы (ГДГ) [7]. Данные исследований приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

t, °С	Активность ферментов, мкМ субстрата/мин/мг белка			Количество кислот	
	ИЦДГ	ГДГ		α-кетоглутаровая, мкг/мл КЖ	флу-тамина-новая, мг/мл КЖ
		NAD-зависимая	NAD-P-зависимая		
<i>R. rugmanes P₁</i>					
30	0,98	0,57	0,83	68,6	27,8
40	0,99	0,49	0,67	127,8	15,3
45	0,96	0,42	0,53	215,3	10,7
<i>A. awamori</i>					
30	0,90	0,53	0,80	62,4	25,7
40	0,75	0,19	0,25	93,8	6,6
45	-	-	-	-	-

Из данных таблицы 2 следует, что при увеличении температуры культивирования в мицелии *R. rugmanes P₁* не снижается активность изоцитратдегидрогеназы, а образование α-кетоглутаровой кислоты в культуральной жидкости возрастает в три раза при температуре 45 °С.

В мицелии мезофильного штамма отмечается снижение изоцитратдегидрогеназной активности при температуре 40 °С, а образование α-кетоглутаровой кислоты возрастает в 1,5 раза.

Глутаматдегидрогеназная активность для обоих штаммов снижается. Особенно это выражено для мезофильного продуцента глю-

коамилазы и, как следствие, снижается содержание глутаминовой кислоты в культуральной жидкости; хотя у *R. rugmanes P₁* этот процесс отмечается при более высоких температурах.

Таким образом, при повышении температуры культивирования у исследуемых микромицетов увеличивается содержание АТР. Количество АТР в клетках *R. rugmanes P₁* к 24 ч. при 45 °С достигает 6,17 Н*моль/мг биомассы вместо 4,88 Н*моль/мг у мезофильного штамма при 40 °С.

Глюкоамилазная активность в мицелии термотолеранта возрастает при температуре 30-45 °С к 48 ч.; в культуральной жидкости максимальная активность (2300 ед/100 см³) проявляется к 72 ч. культивирования при температуре 40 °С.

У мезофильного штамма повышение температуры культивирования до 40 °С приводит к резкому снижению активности фермента к 48 ч. и в мицелии, и в культуральной жидкости.

У термотолерантного штамма при температуре культивирования 30-45 °С практически не изменяется изоцитратдегидрогеназная активность; у мезофильного штамма этот фермент не устойчив к повышенной температуре. Более устойчива к температуре глутаматдегидрогеназа термотолеранта, отвечающая за образование глутамата из α-кетоглутаровой кислоты.

Глутаминовая кислота входит в состав молекулы глюкоамилазы [8]. У термотолерантного штамма количество глутаминовой кислоты составляет 12900 мМ/г белка вместо 4844 мМ/г у мезофильного штамма. Согласно литературным данным [10] повышенное содержание глутаминовой кислоты в молекуле фермента способствует повышению его термостойкости за счет ион-дипольных взаимодействий –СООН групп с фенольным гидроксиллом тирозина; за счет образования двух водородных связей протонированных групп с еще одной –СООН группой; за счет возникновения связи с ионами Са²⁺, содержащимися в молекуле фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1 Позмогова, И. Н. О физиологии термофильных и мезофильных бактерий при оптимальных и супраоптимальных температурах развития [Текст] / И. Н. Позмогова, А. И. Мальянец // Микробиология. -1976.- Т. XLV.- С. 284-289.

2 Григоров, В. С. Получение термотолерантного мутанта *R. pygmanes* P₁ с повышенной активностью глюкоамилазы [Текст] / В. С. Григоров, Н. А. Жеребцов // Микробиология. – 1983. - Т. 52. - № 3. - С. 408-412.

3 Григоров, В.С. Кислотная инактивация глюкоамилазы микроскопических грибов [Текст] / В.С. Григоров, Н.А. Жеребцов // Ферментная и спиртовая промышленность. – 1993. - №2. - С. 34-36.

4 Грачева, И. М. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов [Текст] / И. М. Грачева, Ю. П. Грачев, М. С. Мосичев и др. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - 239 с.

5 Kornberg, A. I. Methods in enzymology [Text] / A. I. Kornberg.- Academic press incorporated, 1998. - 707 p.

6 Fridemann, F. E. [Text] / F. E. Fridmann, Y. E. Haugen. - Biol. Chem, 1993. – 415 p.

7 Doherty, D. Methods in enzymology [Text] / D. Doherty.-Acad. Press INC, 1970. – 850 p.

8 Григоров, В. С. Взаимосвязь термотолерантности микромицетов и термостабильности синтезируемых глюкоамилаз [Текст] / В. С. Григоров, О. С. Корнеева, Т. И. Фурсова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. - № 3. - С. 46-49.

9 Коновалов, С. А. Продуценты амилолитических ферментов [Текст] / С. А. Коновалов. - М.: Пищевая промышленность, 1972.

10 Хашнев, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях [Текст] / Д. Хашнев. – М.: Мир, 1981. – 270 с.

2 Grigorov, V. S. Production of thermo-tolerant mutant *R. pygmanes* P₁ with increased activity of glucoamylase [Text] / V. S. Grigorov, N. A. Zherebtsov // Microbiologiya. - 1983. - V. 52. - № 3. - P. 408-412.

3 Grigorov, V. S. Acid inactivation of glucoamylase microscopic fungi [Text] / V. S. Grigorov, N. A. Zherebtsov // Enzyme and the alcohol industry. - 1993. - № 2. - P. 34-36.

4 Gracheva, I. M. Laboratory workshop on the technology of enzyme preparations [Text] / I. M. Grachev, Y. P. Grachev, M. S. Mosichev et al. – М.: egkaya pishevaya promyshlennost, 1982. - 239 p.

5 Kornberg, A. I. Methods in enzymology [Text] / A. I. Kornberg. - Academic press incorporated, 1998. - 707 p.

6 Fridemann, F. E. [Text] / F. E. Fridmann, Y. E. Haugen. - Biol. Chem, 1993. - 415 p.

7 Doherty, D. Methods in enzymology [Text] / D. Doherty.-Acad. Press INC, 1970. - 850 p.

8 Grigorov, V. S. Relationship micromycetes thermotolerance and thermal stability of the synthesized glucoamylases [Text] / V. S. Grigorov, O. S. Korneev, T. I. Fursova / Storage and processing of agricultural raw materials. - 2008. - № 3. - P. 46-49.

9 Konovalov, S. A. Producers of amyolytic enzymes [Text] / S. A. Konovalov. – М.: Pishhevaya promyshlennost, 1972.

10 Hashnev, D. Life of microbes in extreme environments [Text] / A. Hashnev. – М.: Mir, 1981. - 270 p.

REFERENCES

1 Pozmogova, I. N. On the physiology of mesophilic and thermophilic bacilli under optimal and supraoptimal temperatures of development [Text] / I. N. Pozmogova, A. I. Malyants // Mikrobiologiya. - 1976. - V. XLV. - P. 284 - 289.