



УДК 576:852.15.577.158

АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *ACTINOMYCES STREPTOMYCINI*

Воронина О. И., Товарова И. И., Хохлов А. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Определена активность ряда ферментов углеводного обмена у активного продуцента стрептомицина (*Act. streptomycini*, в штамм 773) и полученного из него нулевого мутанта (штамм 1439) в отсутствие и в присутствии ранее описанного биорегулятора А-фактора. Установлено, что наиболее резко указанные штаммы различаются по активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ). У активного штамма 773 Г6Ф-дегидрогеназная активность практически отсутствует, тогда как у штамма 1439 она выражена очень сильно. В присутствии А-фактора Г6Ф-дегидрогеназная активность штамма 1439 быстро снижается до уровня активности стрептомицинпродуцирующего штамма 773. Действие А-фактора, по-видимому, связано с индукцией синтеза ингибитора, специфически подавляющего активность Г6ФДГ.

При изучении веществ, участвующих в регуляции развития актиномицета *Streptomyces griseus* (*Actinomyces streptomycini*) и в образовании стрептомицина, нами было ранее установлено, что в регуляции этих взаимосвязанных процессов важную роль играет низкомолекулярное вещество, названное А-фактором [1—3]. Было показано, что действие этого биорегулятора проявляется уже на начальных этапах развития актиномицета и может быть связано с использованием им глюкозы, являющейся основным источником углерода в применяемых питательных средах. В связи с этим представлялось интересным изучить активность ферментов углеводного обмена у активного продуцента стрептомицина (*Act. streptomycini*, штамм 773) и у мутантного штамма 1439, не продуцирующего антибиотик.

Предварительные данные, полученные при изучении активности ряда ферментов углеводного обмена у указанных штаммов, показали, что наиболее сильные различия между ними наблюдаются в активности Г6ФДГ.

Как известно, Г6ФДГ (*D*-глюкозо-6-фосфат. NaDP-оксидоредуктаза, КФ1.1.1.49) представляет собой один из ключевых ферментов обмена глюкозы — начальное звено пентозофосфатного пути превращения углеводов — и широко распространена в микроорганизмах в различных тканях животных и растений [4].

Г6ФДГ имеет существенное регулирующее влияние на развитие организмов, в частности, фермент играет важную роль при некоторых генетически обусловленных гемолитических заболеваниях [5, 6] в установлении гормонального статуса организма [7, 8] и т. д.

В настоящей работе изучено влияние А-фактора на активность Г6ФДГ у различных штаммов *Act. streptomycini*.

При определении активности Г6ФДГ у продуцента стрептомицина *Act. streptomycini* (штамм 773) и неактивного мутанта (штамм 1439) было установлено, что активный штамм 773 содержит лишь следовые количества этого фермента, в то время как мутант (штамм 1439) обладает очень высокой активностью Г6ФДГ.

Применение различных способов разрушения клеток актиномицета показало, что при разрушении в ультразвуковом дезинтеграторе активность Г6ФДГ в бесклеточных экстрактах в 2—3 раза выше, чем при разрушении лизоцимом, однако различие в активности фермента между штаммами 773 и 1439 сохранялось прежним.

Удельная активность Г6ФДГ в бесклеточных экстрактах штаммов 773 и 1439 при разрушении клеток ультразвуком равнялась соответственно

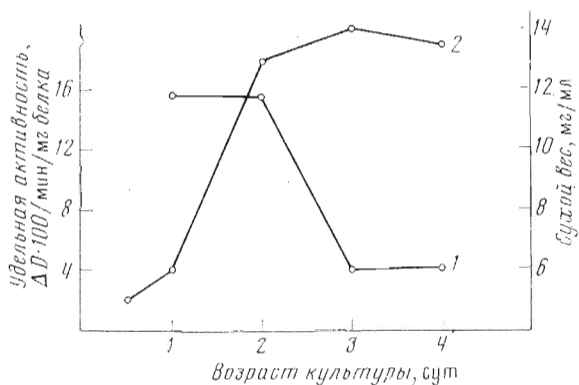


Рис. 1. Изменение активности Г6ФДГ в зависимости от возраста культуры мутанта *Act. streptomycini* (штамм 1439): 1 — активность; 2 — сухой вес биомассы

достигает максимума в период логарифмической фазы роста (1—2 сут), а затем снижается (рис. 1). Изучение влияния pH на активность фермента показало, что оптимум активности Г6ФДГ в экстрактах мицелия нулевого мутанта (штамм 1439) находится в той же области pH (7,5—8,0), что и у дрожжевой Г6ФДГ. На основании этих данных в дальнейших исследованиях использовали мицелий, выращенный в течение 48 ч, а определение Г6Ф-дегидрогеназной активности проводили при pH 7,5.

Как было показано нами ранее [4—3, 9], при выращивании в присутствии А-фактора культура неактивного мутанта (штамм 1439) по ряду свойств (биосинтез стрептомицина, стрептидина и темного пигмента, образование глубинных спор и воздушного мицелия и т. д.) становится очень похожей на исходный активный штамм 773.

В настоящей работе установлено также, что активность Г6ФДГ мутанта (штамм 1439) в присутствии А-фактора снижается до уровня активности стрептомицинообразующего штамма 773.

Влияние А-фактора на снижение активности Г6ФДГ в клетках нулевого мутанта (штамм 1439) было изучено более детально. А-фактор в количестве 0,2—0,5 мкг/мл добавляли в 18—20-часовую культуру мутанта (штамм 1439) и актиномицет выращивали в присутствии А-фактора в течение трех суток. Активность Г6ФДГ определяли в клетках в момент внесения А-фактора и через различное время в процессе роста культуры после добавления А-фактора. Параллельно определяли биомассу (сухой вес) и содержание стрептомицина в культуральной жидкости. Было найдено, что уже через 2 ч роста мицелия в присутствии А-фактора активность Г6ФДГ снижается с 16 до 12 ед., а через 10 ч уменьшается в 8 раз. Через 10 ч в клетках мутанта (штамм 1439) обнаруживали лишь следы Г6Ф-дегидрогеназной ак-

2—3, 30—40, при разрушении лизисом — < 0,5; 11—13.

При разрушении клеток ультразвуком активность Г6ФДГ в бесклеточных экстрактах резко снижается в течение нескольких часов, тогда как активность фермента в лизатах, полученных после обработки клеток в тех же условиях лизоцимом, сохраняется в течение двух суток, поэтому в дальнейшей работе для разрушения клеток использовали лизоцим.

Было выяснено, что в процессе роста штамма 1439 активность Г6ФДГ

тивности. Стрептомицин в небольшом количестве (20 мкг/мл) впервые обнаруживается в 36-часовой культуре, а через 54 ч после добавления А-фактора содержание антибиотика в культуральной жидкости достигает количества, продуцируемого активным питателем (рис. 2). Таким образом, А-фактор вызывает резкое снижение активности Г6ФДГ в растущей культуре *Act. streptomycini* (штамм 1439). Можно предположить несколько механизмов этого явления: инактивация фермента А-фактором или стрептомицином, образующимся в присутствии А-фактора; индукция А-фактором синтеза ингибитора, специфически подавляющего активность Г6ФДГ; торможение А-фактором биосинтеза фермента.

Определение активности Г6ФДГ, проявляемой клетками мутанта (штамм 1439) и очищенного фермента из дрожжей в присутствии А-фактора

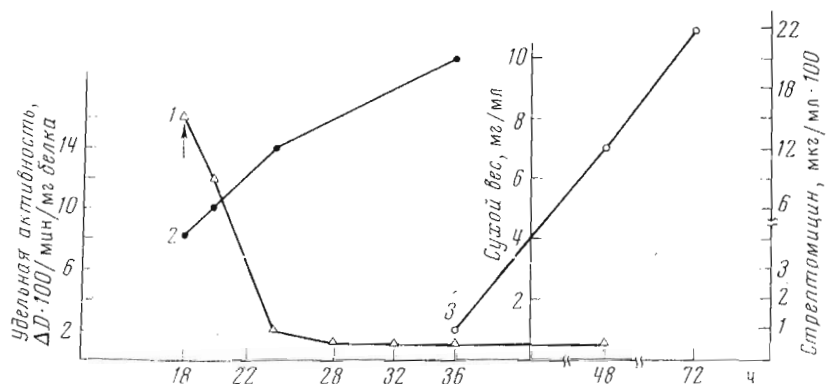


Рис. 2. Снижение активности Г6ФДГ при выращивании *Act. streptomycini* (штамм 1439) в присутствии А-фактора: 1 — активность фермента; 2 — биомасса (сухой вес); 3 — содержание стрептомицина. Стрелкой показан момент добавления А-фактора

(0,1—10 мкг/мл) или стрептомицина (10—1000 мкг/мл), показало, что А-фактор и антибиотик не снижают активность Г6ФДГ.

В то же время были получены данные, свидетельствующие о том, что А-фактор индуцирует синтез ингибитора, блокирующего активность Г6ФДГ. Было обнаружено, что в клетках штаммов 773 и 1439, если последний выращивать в присутствии А-фактора, содержится вещество, подавляющее активность Г6ФДГ. Например, в присутствии экстракта клеток продуцента стрептомицина (штамм 773) дрожжевая Г6ФДГ не проявляет активности. Экстракт активного штамма 773 подавляет также активность Г6ФДГ, содержащейся в клетках нулевого мутанта (штамм 1439). Эти результаты позволяют предположить, что активный продуцент стрептомицина (штамм 773), а в присутствии добавленного А-фактора и нулевой мутант (штамм 1439) образуют специфический ингибитор Г6ФДГ. Это предположение было подтверждено специальным опытом. А-фактор в количестве 0,2—0,5 мкг/мл добавляли к 20-часовой культуре мутанта (штамм 1439), которую в присутствии А-фактора выращивали в течение 10 ч. Через 3, 6 и 10 ч роста в клетках актиномицета определяли Г6Ф-дегидрогеназную активность и степень подавления экстрактами выращенных клеток активности Г6ФДГ. Тормозящее действие контролировали по подавлению Г6Ф-дегидрогеназной активности экстракта 20-часовой культуры клеток мутанта (штамм 1439), выращенных без А-фактора, или по торможению активности дрожжевой Г6ФДГ. Для этого к реакционной смеси, содержащей все компоненты для определения Г6Ф-дегидрогеназной активности и фермент (0,1 мл бесклеточного экстракта 20-часовой культуры нулевого мутанта с содержанием 0,1 мг белка или 0,1 мл раствора дрожжевой Г6ФДГ известной активности) прибавляли 0,1 мл бесклеточного экстракта (0,1 мг белка) культуры мутан-

та (штамм 1439), полученные соответственно через 3, 6 или 10 ч выращивания актиномицета в присутствии А-фактора. Активность ферментов определяли спектрофотометрически. Как видно из рис. 3, снижение Г6Ф-дегидрогеназной активности бесклеточных экстрактов мутанта (штамм 1439), выращиваемого в присутствии А-фактора, сопровождается увеличением их способности подавлять активность Г6ФДГ. Аналогичное торможение Г6Ф-дегидрогеназной активности вызывают также и бесклеточные экстракты активного штамма 775, образующего стрептомицин и А-фактор. Данные о степени торможения активности дрожжевой Г6ФДГ в зависимости от количества бесклеточного экстракта активного штамма *Act. streptomycini*

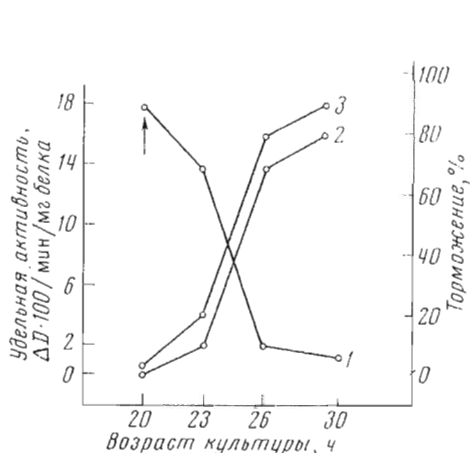


Рис. 3

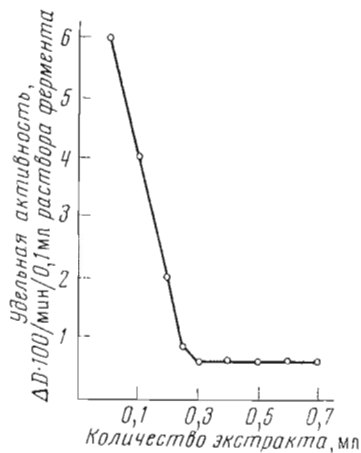


Рис. 4

Рис. 3. Увеличение ингибиторного действия бесклеточных экстрактов *Act. streptomycini* (штамм 1439) на активность Г6ФДГ при выращивании культуры в присутствии А-фактора: 1 — активность Г6ФДГ в бесклеточных экстрактах (клетки выращивали в присутствии А-фактора); 2 — торможение активности Г6ФДГ 20-часовой культуры штамма 1439 (выращивание без А-фактора) и 3 — торможение дрожжевой Г6ФДГ бесклеточными экстрактами штамма 1439 (выращивание в присутствии А-фактора). Стрелкой показан момент добавления А-фактора

Рис. 4. Торможение активности дрожжевой Г6ФДГ бесклеточными экстрактами *Act. streptomycini* (штамм 773). К реакционной смеси, содержащей все необходимые компоненты для определения Г6Ф-дегидрогеназной активности и 0,2 мл раствора дрожжевой Г6ФДГ, добавляли 0,1—0,7 мл бесклеточного экстракта (0,12 мг/мл белка)

773 представлены на рис. 4. Как видно из рис. 4, имеется определенное количество ингибитора, которое практически полностью инактивирует Г6ФДГ.

Таким образом, в настоящей работе представлены доказательства, что действие А-фактора связано с индукцией в клетках *Act. streptomycini* синтеза ингибитора, специфически подавляющего активность Г6ФДГ. Возможно, именно изменение Г6Ф-дегидрогеназной активности лежит в основе остальных биохимических изменений, возникающих в клетках нулевого мутанта штамма 1439 при его выращивании в присутствии А-фактора.

### Экспериментальная часть

В работе использовали активный продуцент стрептомицина *Act. streptomycini* (штамм 773) и неактивный мутант (штамм 1439), который был получен из активного штамма 773 обработкой химическими мутагенами [9]. Оба штамма выращивали на синтетической среде, содержащей глюкозу (4%) и молочную кислоту (1,2%) в качестве источников углерода и сернокислый аммоний в качестве источника азота. Для определения ферментативной активности, как правило, использовали 48-часовую культуру.

*Получение бесклеточного экстракта.* Мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием и промывали 2—3 раза физиологическим раствором. Для истощения эндогенных запасов клеток суспензию мицелия в физиологическом растворе встряхивали 18—20 ч. Затем биомассу отделяли центрифугированием, промывали 0,1 М трис-НСl буфером (рН 7,4). Промытый мицелий замораживали при  $-15^{\circ}$ . В замороженном мицелии активность Г6ФДГ заметно не снижается в течение двух-трех месяцев. Замороженные клетки оттаивали при  $0^{\circ}$  и разрушали при помощи лизоцима или обработкой в ультразвуковом дезинтеграторе. Лизис при помощи лизоцима (1 мг лизоцима в 1 мл суспензии клеток, содержащей 4—6 мг белка) осуществляли в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 0,006 М  $MgCl_2$  и 0,005 М дитиотреит, при  $37^{\circ}$  в течение 1,5—2 ч. Разрушение ультразвуком проводили при  $0^{\circ}$  в ультразвуковом дезинтеграторе типа MSE, при этом периоды действия ультразвуком (3-кратно по 3 мин) чередовали с прекращением его действия (2 мин.). Разрушенные клетки подвергали центрифугированию при 2000 об/мин (10—15 мин) и затем при 15 000 об/мин (40 мин). Надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента.

В большинстве случаев бесклеточные экстракты освобождали от низкомолекулярных соединений фильтрацией через колонку с сефадексом G-25 (средний). Фракционирование проводили в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,4).

*Активность Г6ФДГ* определялась спектрофотометрически (340 нм) по восстановлению NADP [10], используя спектрофотометр «Spectrum» UV VIS (ГДР). Состав реакционной смеси: 48 мМ триэтаноламиновый буфер (рН 7,6), 0,67 мМ глюкозо-6-фосфат (Na-соль, фирма «Reanal», Венгрия), 0,5 мМ NADP (Na-соль, фирма «Reanal», Венгрия), 6,7 мМ  $MgCl_2$ . Бесклеточный экстракт добавляли в количестве 0,05—0,2 мл (0,25—1 мг белка на пробу). Общий объем реакционной смеси 2 мл. Скорость реакции определяли в течение 2—3 мин линейного периода восстановления NADP. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывало увеличение оптической плотности на 0,01 за 1 мин. Удельную активность фермента выражали в пересчете на 1 мг белка (при определении активности фермента в бесклеточных экстрактах) или на 0,1 мл раствора фермента (при определении активности очищенной дрожжевой Г6ФДГ; препарат фирмы «Fluka», Швейцария).

Содержание стрептомицина в культуральной жидкости определяли методом диффузии в агар с использованием в качестве тестмикрорганισμού *Bac. mycoides*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хохлов А. С., Товарова И. И., Борисова Л. Н., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Корницкая Е. Я., Ивкина Н. С., Рапопорт И. А. (1967) Докл. АН СССР, **177**, 232—235.
2. Товарова И. И., Корницкая Е. Я., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Ависова Л. Н., Хохлов А. С. (1970) Изв. АН СССР. Сер. биол., 427—434.
3. Khokhlov A. S., Tovarova I. I. (1972) Post. Hig. Med. Dosv., **26**, 469.
4. Noltman E. A., Kuby S. A. (1963) in The Enzymes (Second Edition) vol. 7, p. 223—246, Academic Press, N.Y.-London.
5. Marks P. A., Johnson A. B. and Hishberg E. (1958) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 529—533.
6. Carson P. E. (1960) Fed. Proc., **19**, 995—1006.
7. Glock G. E. and McLean P. (1955) Biochem. J., **61**, 397—402.
8. Oka T. and Perry J. W. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 3586—3591.
9. Борисова Л. Н., Ивкина Н. С., Рапопорт И. А. (1966) Докл. АН СССР, **171**, 728—731.
10. Bergmeyer H. U. (1970) in Methoden der enzymatischen Analyse, 2 Auflage, Band I, 599—600, Akademie — Verlag, Berlin.

Поступила в редакцию  
30.XII.1974

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY  
IN DIFFERENT STRAINS OF *ACTINOMYCES STREPTOMYCINI*

VORONINA O. I., TOVAROVA I. I., KHOKHLOV A. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the U.S.S.R., Moscow*

The effect of the previously described bioregulator (A-factor) on the glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in the streptomycin producing strain of *Actinomyces streptomycini* 773 and its zero mutant 1439 was investigated. The mutant strain 1439 (not producing A-factor) has 10—15-fold greater enzyme activity as compared to the strain 773 (producing streptomycin and A-factor). The addition of A-factor to the growing culture of the mutant 1439 causes the reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to the level of that in streptomycin producing strain 773. Cell-free extracts of the strains 773 and 1439 exert, of the latter is grown in the presence of A-factor, the inhibitory effect on the enzyme activity. Apparently, A-factor induces formation of a dehydrogenase inhibitor which interferes with the carbohydrate metabolism of the actinomycetes.

---