



УДК 602:577.113.3 (075.8)

Роль гликолиза при микробиологическом синтезе нуклеозидфосфатов из предшественников у коринеформных бактерий

В. Ж. Цыренов, И. О. Пинуев, А. А. Санданов

Восточно-Сибирский государственный технологический университет, Улан-Удэ
E-mail: office@esstu.ru

Аннотация. Исследован гликолиз в качестве источника энергии при микробиологическом синтезе нуклеозидфосфатов из предшественников (пуринов) у коринеформных бактерий. В опытах с бесклеточными экстрактами *Corynebacterium flavum* – ВСТИ 301, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 с помощью метода меченых атомов показано, что основным источником энергии при образовании нуклеозидди- и трифосфатов (ADP, ATP, GDP, GTP) из нуклеозидмонофосфатов (AMP, GMP) является гликолиз.

Ключевые слова: гликолиз, нуклеотид фосфаты, фосфорибозилпирофосфат, рибоза-5-фосфат, биосинтез АТФ, АМФ, АДФ, микробиологический синтез.

Вещества нуклеотидной природы участвуют в наиболее важных процессах жизнедеятельности: функционировании наследственного аппарата и биосинтеза белков, регуляции биохимических процессов и энергетическом обмене. Все более расширяется область их практического использования в качестве лекарств, применения их в производстве реактивов, лекарств, вкусовых добавок и других ценных препаратов для нужд химической, фармацевтической и пищевой промышленности.

Из методов получения нуклеозидфосфатов наиболее перспективным является микробиологический метод, который на практике осуществляется двумя способами. Первый способ – прямая ферментация с применением ауксотрофных мутантов. Второй способ микробиологического синтеза – сэлвидж (salvage)-синтез. Он основан на реакциях реутилизации низкомолекулярных продуктов катаболизма нуклеиновых кислот (пурины, пиримидины и их нуклеозиды). В техническом плане сэлвидж-синтез основан на применении специально подобранного микроорганизма, осуществляющего рибозилирование и фосфорилирование пуриновых и пиримидиновых оснований, их нуклеозидов или синтетических аналогов низкомолекулярных компонентов нуклеиновых кислот.

Автор с сотрудниками в течение длительного времени (с 1970 г.) разрабатывает теоретические и прикладные аспекты сэлвидж-синтеза нуклеозидфосфатов и нуклеотидных

коферментов. Ими открыта ранее не известная реакция синтеза ADP и впервые исследован кофермент пирофосфат: ADP-фосфотрансфераза, описан новый механизм регуляции. Впервые в России автором получены штаммы-продуценты нуклеотидов, разработана технология получения препаратов ATP, NAD, GTP и других нуклеотидов [2]. Технологии получения нуклеотидов внедрены на Олайнском заводе химреактивов (1973–1981 гг.).

Данная статья посвящена исследованию гликолиза в качестве возможного источника при сэлвидж синтезе нуклеозидфосфатов у штаммов продуцентов из крупы коринеформных бактерий.

Материалы и методы

Исследовали микроорганизмы из группы коринеформных бактерий, осуществляющих сэлвидж-синтез нуклеотидов: *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301 (Цыренов В. Ж., и др. Авторское свидетельство 726161, СССР, 1980) и мутейный штамм *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 [1], который в настоящее время известен как *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872. Исследование механизма биосинтеза нуклеотидов у упомянутых выше микроорганизмов было проведено на примере образования ATP из аденина и GTP из гуанина с использованием бесклеточного экстракта.

Проведение ферментаций описано ранее [4]. Для получения бесклеточного экстракта использовали двухсуточную культуру. Для

изучения энзиматических реакций, участвующих в биосинтезе АТР, ГТР из аденина и гуанина использовались 6 составов реакционной смеси. Смесь № 1: ФРПФ 0,5 мкМ, аденин 0,6 мкМ, С14-аденин (гуанин) 12·10⁵ имп/мин, MgCl₂ 5 мкМ, трис-НСl-буфер (рН 8,0) 10 мкМ и экстракт энзимов 0,5 мг по белку в конечном объеме 1 мл. При испытании рибозо-5-фосфата (Р-5-Ф) в качестве рибозильного компонента АТР использовали: смесь № 2: Р-5-Ф 1 мкМ, аденин 0,6 мкМ, С14-аденин 12·10⁵ имп/мин, АТР 0,5 мкМ, MgCl₂ 5 мкМ, трис-буфер (рН 8,0) 10 мкМ и экстракт 1,2 мг белку в конечном объеме 1 мл; смесь № 3 – смесь № 2 без Р-5-Ф; смесь № 4 – смесь № 2 без АТР и смесь № 5: смесь № 2 без аденина. Для исследования фосфорилирования АМР до АТР составляли смесь № 6: Р-5-Ф 0-15 мкМ, MgCl₂ 5 мкМ, трис-НСl -буфер (рН 8,0) 10 мкМ, АМА – 0,3 мкМ, С14-АМР 12,5·10⁵ имп/мин и экстракт 1,2 мг по белку в конечном объеме 1 мл. Инкубацию проводили при 30 °С, без встряхивания. Реакция останавливалась добавлением 0,1 мл 60%-ной трихлоруксусной кислоты.

Образующиеся в реакционной смеси нуклеотиды определяли с помощью бумажной хроматографии. Радиоактивность измеряли жидкостным сцинтилляционным счетчиком SL-30 («Intertecnikе»).

Удельную активность бесклеточного экстракта выражали как нМ нуклеотида (АМР, GMP, ADP, GDP, или АТР, ГТР) в расчете на 1 мг белка. Количество нуклеотидов в нМ рассчитывали, исходя из распределения в них радиоактивности.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано [3], что в клетке и в культуральной жидкости штаммов продуцентов накапливается большое количество до 4 мг/мл пентозофосфатов (Р-5-Ф, ФРПФ). Также было показано, что ФРПФ используется в аденинфосфорилтрансферазной реакции с образованием АМР. При этом была использована реакционная смесь № 1, состоящая из С¹⁴-аденина, ФРПФ, MgCl₂ буфера и экстракта энзимов.

Было сделано наблюдение о том, что если в реакционной смеси № 1 заменить ФРПФ на Р-5-Ф и АТР (создавая, таким образом, реакционную смесь № 2), то в этих измененных условиях также интенсивно происходило образование АМР.

Исходя из этого наблюдения, мы попытались определить роль отдельных компонентов

реакционной смеси № 2, ставили опыт с бесклеточным экстрактом, в вариантах которого последовательно исключали из состава реакционной смеси тот или иной компонент.

Как видно из данных таблицы 1 в реакционной смеси № 3 (которая в отличие от смеси № 2 не содержала Р-5-Ф) обнаруживаются следовые количества различных нуклеозидфосфатов. Это, по-видимому, объясняется дефицитом или отсутствием ФРПФ.

В реакционной смеси № 4 (которая в отличие от смеси № 2 не содержала АТР) наблюдался синтез нуклеозидфосфатов, в том числе значительных количеств АТР.

Это свидетельствует о том, что в смеси № 4, содержащей бесклеточный экстракт, происходят определенные процессы, которые обуславливают образование из Р-5-Ф АТР, необходимый для синтеза ФРПФ в ФРПФ-синтезной реакции. Таким образом, АТР не является необходимым компонентом реакционной смеси, когда используется бесклеточный экстракт.

Аналогичный результат был получен при ферментации гуаниновых нуклеозидфосфатов с помощью *Corynebacterium flavum*.

Для среды № 4 были определены оптимальные концентрации субстратов: для Р-5-Ф-357 мкМ и для аденина – 700 мкМ. Оптимальное значение рН трис-НСl -буфера для образования АТР в этой смеси вставляла около 8,0.

Если в смеси № 1 (содержащей ФРПФ) происходит образование только АТР то в среде №4 (содержащей Р-5-Ф) – синтез нуклеозидфосфатов, включая АТР. Такой результат (который в определенной мере был неожиданным, поскольку Р-5-Ф является более простым соединением, чем ФРПФ) наводил на мысль, что Р-5-Ф является не только источником рибозильной части нуклеотидов, но и субстратом процессов, обеспечивающих фосфорилирование нуклеозидмонофосфата до нуклеозидтрифосфата (например, АМР до АТР).

Данное предположение было проверено с использованием реакционной смеси № 6, состоящей из Р-5-Ф, С14-АМР или С14-GMP, трис-НСl буфера, MgCl₂ и бесклеточного экстракта. В первую очередь, было изучено влияние различных концентраций, Р-5-Ф на образование АТР у коринеформных бактерий (табл. 2.).

Обнаружилась четкая зависимость степени фосфорилирования от концентрации Р-5-Ф. Наблюдался синтез нуклеозидди- и трифосфатов в контрольных образцах, куда не добавляли Р-5-Ф. Это, очевидно, связано с наличием в

бесклеточном экстракте доноров макроэргических фосфатных групп, полифосфатов.

Зависимость фосфорилирования нуклеозидмонофосфата от концентрации субстрата указывает на возможную роль гликолиза. Известно, что фосфоглюконатный путь, одним из промежуточных продуктов второго является Р-5-Ф, на одном из этапов может перейти в гликолитический, т. е. Р-5-Ф может стать субстратом гликолиза, энергетический эффект которого в данном случае обеспечивает фосфорилирование нуклеозидмонофосфата. Для проверки этого предположения был поставлен опыт с реакционной смесью № 4, в которой вместо Р-5-Ф была взята глюкоза (табл. 3).

Как видно из данных таблицы 3, наблюдалось заметное образование нуклеозидфосфатов в случае замены Р-5-Ф глюкозой. Наиболее высокий уровень синтеза АТР и ГТР обнаруживается при концентрации глюкозы 6 мкМ.

Образование нуклеотидов при добавлении глюкозы, свидетельствует об участии гликолиза в фосфорилировании монофосфатов.

Проведенные нами опыты показали, что в реакционной смеси № 4 образование АТР происходит через АМР. Количество АМР также возрастало в присутствии NaF, являющегося ингибитором гликолиза. Ингибирующий эффект NaF на фосфорилирование АМР до АТР усиливался в присутствии фосфатов (табл. 4.)

Таблица 1

Испытание Р-5-Ф в качестве источника рибозильной части АТР

Реакционная смесь	Основные компоненты реакционной смеси	Удельная активность экстракта, нМ/мг		
		C ¹⁴ -АТР	C ¹⁴ -АДР	C ¹⁴ -АМР
№ 2	Р-5-Ф, АТР.	28,6 (±2,9)	67,4(±3,8)	108 (±9,9)
№ 3	Смесь № 2 без Р-5-Ф	Следы	Следы	Следы
№ 4	Смесь № 2 без АТР	135 (±)	76,9 (±6,1)	24,3 (±1,8)
№ 5	Смесь № 2 без аденина	Следы	Следы	Следы

Таблица 2

Влияние концентрации Р-5-Ф на образование пуриновых нуклеозидди- и три-фосфатов у *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301 и *Corynebacterium ammoniagenes* АТСС 6872*

№ варианта	Р-5-Ф мкМ	Удельная активность экстракта, нМ/мг, 30 мин			
		C ¹⁴ -АДР	C ¹⁴ -ГДР	C ¹⁴ -АТР	C ¹⁴ -ГТР
1	0	25,2	20,8	40,7	21,6
2	5	75,2	36,9	62,0	30,9
3	10	97,8	45,6	74,0	40,6
4	15	72,6	32,4	61,2	31,7

*Использована реакционная смесь № 6 состава: Р-5-Ф, концентрация указана в таблице, MgCl₂ 5 мкМ, трис-НСl -буфер (рН 8,0) 10 мкМ, АМР – 0,3 мкМ, C¹⁴-АМР 12,5·10⁵ имп/мин и экстракт 1,2 мг по белку в конечном объеме 1 мл. Радиоактивность на единицу веса продукта (АДР, АТР) составляла 4,18·10³ имп/мин на 1 нМ. В случае синтеза ГТР использовался GMP, C¹⁴-GMP.

Таблица 3

Влияние концентрации глюкозы на образование нуклеозидфосфатов пуринового ряда бесклеточным экстрактом *C. flavum* ВСТИ 301

№ варианта	Глюкоза, мкМ	Удельная активность экстракта, нМ/мг, 30 мин					
		АМР	GMP	АДР	GDP	АТР	ГТР
1	0	1,2	1,3	3,1	2,8	14,6	12,1
2	2	3,2	1,7	5,2	4,1	26,0	14,2
3	4	7,1	3,7	10,1	6,4	44,0	26,4
4	6	8,2	4,5	11,0	5,9	50,2	28,7
5	8	7,4	3,4	9,8	4,3	42,1	22,6
6	10	2,1	1,5	4,8	4,2	26,5	14,8

Влияние фторида натрия и фосфатов на образование нуклеозидфосфатов бесклеточным экстрактом *C. flavum* ВСТИ 301

Буфер	NaF, 100 мкМ	Удельная активность экстракта, нМ/мг белка, 30 мин		
		C ¹⁴ -АТФ	C ¹⁴ -АДР	C ¹⁴ -АМР
Трис-НСl буфер, рН 8,0	-	96	102	29
Трис-НСl буфер, рН 8,0	+	21,0	36,1	42,8
Трис-НСl буфер, рН 9,0	+	30,2	61,2	71,5
Na-фосфатный буфер, 10 мкМ, рН 7,4	-	22,7	58,6	174,1
Na-фосфатный буфер, 10 мкМ, рН 7,4	+	9,1	25,7	98,7

Заключение

В работе показана взаимосвязь энергетического обеспечения с элвидж-синтеза нуклеозидфосфатов у коринеформных бактерий с процессом гликолиза.

Литература

1. Лукин Н. С. Влияние компонентов среды на метаболизм культуры *Brevibacterium ammoniagenes* – продуцента 5-инозиновой кислоты / Н. С. Лукин, Л. А. Казаринова Л. И. Ерохина // Прикладная биохим. и микробиол. – 1978. – Т. 14. – С. 565–572.

2. Цыренов В. Ж. Микробиологический синтез нуклеозидфосфатов / В. Ж. Цыренов – М. : Наука, 1990. – 200 с.

3. Санданов Ч. М. Изучение метаболического механизма синтеза адениновых нуклеотидов из экзогенного аденина у коринеморфных бактерий / Ч. М. Санданов, И. В. Ерошина, В. Ж. Цыренов // Микробиология. – 1981. – Т. 50, Вып.6. – С. 1053–1056.

4. Tsirenov V. Zh. Concerning peculiarities of NAD biosynthesis regulation by producer strains of microorganisms / V. Zh. Tsirenov [et al.] // Biotechnology and industry Editor G. E. Saikov. – Nova Science Publishers Inc., 2004. – P. 55–74.

The role of glycolis at the microbiological synthesis of nucleoside phosphates from predecessors at corinebacteria

V. Zh. Tsirenov, I. O. Pinuev, A. A. Sandanov

East-Siberian State Technological University, Ulan-Ude

Abstract. The glycolis has been studied as an energy source for microbiological synthesis of nucleoside phosphates from predecessors at Corinebacteria. In experiences with uncellular extracts of *Corynebacterium flavum* – ВСТИ 301 and *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 by means of a method labeled atoms has been shown that, что glycolis is main energy source for synthesis of nucleosidedi- and triphosphates (ADP, ATP, GDP, GTP) from nucleosidmonophosphates (AMP, GMP).

Key words: Glycolis, nucleoside phosphates, phosphorylation, phosphoribosl pirophosphate, ribose-5-phosphate, biosynthesis ATP AMP ADP, microbiological synthesis.

Цыренов Владимир Жигжитович
Восточно-Сибирский государственный
технологический университет,
Институт пищевой инженерии и биотехнологии
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а
доктор биологических наук, профессор
зав. кафедрой биотехнологии
тел. (301 2) 41–71–46, факс (301 2) 43–14–15
E-mail: office@esstu.ru

Tsirenov Vladimir Zhighitovitch
East-Siberian State Technological University
670013, Ulan-Ude, 40-a, Klyuchevskaya St.
D. Sc. in Biology, prof, Head of Department
of Biotechnology
phone: (301 2) 41–71–46, fax: (301 2) 43–14–15
E-mail: office@esstu.ru

Пинуев Иван Очирович
Восточно-Сибирский государственный
технологический университет
кандидат биологических наук,
доцент кафедры биотехнологии
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а
тел. (301 2) 41-71-46, факс (301 2) 43-14-15

Санданов Александр Андреевич
Восточно-Сибирский государственный
технологический университет
аспирант
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а
тел. (301 2) 41-71-46, факс (301 2) 43-14-15

Pinuev Ivan Ochirovich
East-Siberian State Technological University
670013, Ulan-Ude, 40-a, Klyuchevskaya St.
Ph. D. in Biology, ass. prof
phone: (301 2) 41-71-46, fax: (301 2) 43-14-15

Sandanov Aleksandr Andreevich
The East-Siberian State Technological University
670013, Ulan-Ude, 40-a, Klyuchevskaya St.
doctoral student
phone: (301 2) 41-71-46, fax: (301 2) 43-14-15