

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ

Светла Трифонова Данова

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ НЯКОИ АСПЕКТИ НА ПЪРВИЧНИЯ
МЕТАБОЛИЗЪМ НА *STREPTOMYCES ALBOGRISEOLUS* 444 И
НЕГОВИЯ НИСКОПРОДУКТИВЕН ВАРИАНТ ВЪВ ВРЪЗКА С
РЕГУЛАЦИЯТА НА АНТИБИОТИКООБРАЗУВАНЕТО.**

Автореферат

НА ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на научна и образователна степен
"доктор "

Научен ръководител : доц. г-р Искра В. Иванова
Научен консултант: проф. гбн Изнат Минков

Официални рецензенти: проф.гбн.Стоян С. Влахов
ст.н.с.П ст.Мария Б.Ангелова,кбн

СОФИЯ
1997

Дисертационният труд съдържа 152 стандартни машинописни страници основен текст, 58 фигури и 15 таблици. Библиографията е представена от 318 заглавия, от които 39 на кирилица и 279 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски"

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 07.07.1997 от 14 ч в заседателната зала на Националния център по заразни и паразитни болести, София, бул. Я. Сакъзов №26.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на съвета - НИЗПБ, "Научен отдел", бул. Я. Сакъзов №26..

**СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ,
ВИРУСОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ ПРИ ВАК**

Светла Трифонова Данова

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ НЯКОИ АСПЕКТИ НА ПЪРВИЧНИЯ
МЕТАБОЛИЗЪМ НА *STREPTOMYCES ALBOGRISEOLUS* 444 И
НЕГОВИЯ НИСКОПРОДУКТИВЕН ВАРИАНТ ВЪВ ВРЪЗКА С
РЕГУЛАЦИЯТА НА АНТИБИОТИКООБРАЗУВАНЕТО.**

Автореферат

НА ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на научна и образователна степен
"доктор "

Научен ръководител : **доц. г-р Искра В. Иванова**
Научен консултант: **проф. гбн Игнат Минков**

Официални рецензенти: **проф.гбн.Стоян С. Влахов**
ст.н.с.П ст.Мария Б.Ангелова,кбн

СОФИЯ
1997

Стрептомицетите като типични почвени микроорганизми се намират под въздействието на променящата се съвкупност от механични, физични, химични и биологични фактори на средата. За да могат да съществуват при тези, непрекъснато променящи се условия, те трябва да са в състояние да управляват сложните биосинтетични процеси и да насочват адекватно работата на метаболитния си апарат. Това се осъществява чрез наследствено закрепени, сложни и фино балансирани, регулаторни механизми, осигуряващи икономичност и висока степен на координация на метаболитните процеси.

Реакциите на първичния метаболизъм, идентични за всички живи същества, протичат с висока специфичност и обезпечават клетката с необходимите биосинтетични медиатори, енергия и съществени макромолекули като ДНК, РНК, протеини, липиди, полизахариди и др.

Някои таксономични групи между които и стрептомицетите, използвайки един или друг от основните ензими или специални синтетази, са способни да синтезират специфични метаболити с необичайна химична структура наречени вторични метаболити. Много от тях са производни на междинни метаболити от централните пътища на първичния метаболизъм. Вторичните метаболити се синтезират при голямо разнообразие на биосинтетичните пътища, които се регулират по комплексен начин. Активирането на определен път се влияе от природата и концентрацията на въглеродните, азотните и фосфатните източници, при определени условия на хранителен режим. Този тип контрол е високо специфичен за всеки щам и даже за всеки продуциран вторичен метаболит.

Съществуват много неясноти относно взаимодействието между първичен и вторичен метаболизъм и механизмите на локална и глобална регулация. Глобалните регулаторни системи са тези, които потенциално контролират началото на вторичния метаболизъм на базата съществуващото взаимодействие между условията на средата и продуцента на биологично активни вещества. Начинът по който информацията (хранителна или с друга природа) се превежда към регулаторните гени, чиито продукти активират съответните биосинтетични гени, е все още неизвестен. Слабо са проучени ензимите и регулацията на метаболизма на глюкозата при актиномицетите, в това число и стрептомицетите.

Сравнителното изучаване на *S. albogriseolus* 444 и на неговия нископродуктивен вариант, чрез изследване на някои аспекти на първичния метаболизъм и по-специално активирането на ензими, участващи в катаболизирането на захари, енергетичния метаболизъм в съчетание с диференциацията на стрептомицетната клетка, би могло да допринесе за идентификацията на онзи хипотетичен сигнал, отговорен за първоначалното включване на вторичния метаболизъм.

Познаването на взаимодействието между първичния и вторичния метаболизъм при микроорганизмите - продуценти на биологични вещества, което е основа за разкриване регулаторните механизми на процесите на диференциация и синтеза на вторични метаболити определя целта на настоящия дисертационен труд: да се проучат различни аспекти от първичния метаболизъм на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

За постигането на набелязаната цел бяха поставени следните задачи:

1. Сравнително изучаване на ензими, участващи в основни метаболитни пътища (Път на Ембден-Майерхоф-Парнас, Пентозо-фосфатния цикъл, Цикъл на трикарбоновите киселини), при *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.
2. Изследване на ензима НАД киназа, като ключов ензим координиращ основните катаболитни и анаболитни процеси при *S. albogriseolus* 444.
3. Изолране на мембранносвързана АТФаза от щама - продуцент и неговия нископродуктивен вариант и изучаване участието и в енергообезпечаването и подържането хомеостаза на клетката.
4. Изучаване на синтеза на екстрацелуларни протеолитични ензими от *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант в процеса на развитието им в течни и твърди хранителни среди и ролята на тези ензими в диференциацията на щамовете.
5. Значението на калциевите йони като ефектор на физиологичния отговор в стрептомицетната клетка.
6. Изследване влиянието на собственорудуцирания антибиотик върху растежа, диференциацията и метаболитната активност на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

Материали и Методи

1. Микроорганизми и условия за култивиране

1.1. Микроорганизми:

Обект на изследване е шам *Streptomyces albogriseolus* 444 (Тодоров и др., 1981). и негов нископродуктивен вариант *Streptomyces albogriseolus* 444-0 (Антонова и др., 1986), предоставени от колекцията на катедрата по "Обща и промишлена микробиология". Продуцент е на антибиотичен комплекс с широк антимикробен спектър (Тодоров и др., 1981), в състава на който са определени три компонента - полиетерен, полиенов и макролиден. Интерес представлява противовирусното действие на полиетерния компонент (А-444, пандавир, нигерицин), който притежава йонофорни свойства.

1.2. Тест култура - Антибиотичното действие бе изпитвано срещу тест - *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

1.3. Хранителни среди:

- Поддържането на стрептомицетните шамове - Минерална среда 1 по Гаузе
- Получаване на дълбочинни спори - среда FM (Ochi, 1987).
- Получаване на въздушни спори - среди ISP₂, Минерална среда 1 по Гаузе
- Култивиране на тест - култура *B. subtilis* ATCC 6633 - хранителна среда със следния състав (g/l): K₂HPO₄ - 0.45, K₂HPO₄ - 0.64, месен екстракт - 2.5, глюкоза-10, агар-1; pH-6.9 -7.2

- Получаване на протопласти - хранителна среда YEME (Norwood et al., 1985).
- Дълбочинно култивиране - в хранителни среди: модифицирана Минерална среда I по Гаузе (с глюкоза- 20 g/l) и среда FM (Ochi, 1986).

1.4. Условия на култивиране:

В зависимост от целта на изследванията шамовете бяха култивирани при 28°C, върху агарови среди - Минерална среда I по Гаузе, ISP₂ (във вид на плътен растеж) и в течни хранителни среди - FM, модифицирана Минерална среда 1 по Гаузе (с глюкоза) и YEME, с продължителност според целта на експериментите. Дълбочинното култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант бе осъществено в Ерленмайерови колби с вместимост 500 ml, съдържащи 100 ml от съответната среда, на ротационен клатачен апарат при 220 об/мин, в условията на двустепенна ферментация. Количеството на посевния материал, използван за инокулиране на посевната среда бе 1% (спорова суспензия с гъстота на спорите 10⁹/ml). Количеството на инокулума за посяване на ферментационните среди бе 5% (вегетативен мицел).

1.4. Получаване на спорова суспензия - по метода на (Norwood et al., 1985).

1.5. Условия на глазуване:

Мицелът на добре развита 48 часова култура на двата варианта на щама бе промит двукратно със стерилен физиологичен разтвор и прехвърлен в 100 ml среда (Минерална среда 1 по Гаузе или FM), съдържаща според целта на експеримента CaCl₂ в различни концентрации (1.5, 5 и 30 mM) или в 100 ml среда FM, без един от следните компоненти: пептон, фосфат, глюкоза. В някои експерименти бе добавян към ферментационната среда нигерицин, в различни концентрации (1.5, 10, 50 и 100 µg/ml)

2. Методи на изследване

2.1. Биохимични изследвания

2.1.1. Определяне на активността на ензими от въглеродния метаболизъм.

Активността им е определяна в динамика:

Малатдехидрогеназа (Е.К.1.1.1.37)- спектрофотометрично при 340 nm (Bergmeyer & Bernet 1974), по увеличението на оптичката плътност в резултат на редуцирането на НАД в присъствие на малат;

Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (Д-глюкозо-6-фосфат НАДФ оксигоредуктаза (ЕК1.1.1.49) - по метода на Kuby et al. (1966);

Алдолаза (фруктозо-1-6 дифосфат-Д-глицералдехид-3-фосфатлиаза, Е.К.4.1.2.13) - колориметрично чрез измерване на алкалолабилния фосфор на триозофосфатите (Северин & Соловев, 1989),

Пируват киназа (АТФ:пируват-фосфотрансфераза, ЕК 2.7.1.40)- спектрофотометрично при 340 nm, с готов тест на фирмата Boeringer Mannheim GmbH

Суцинат-генхидрогеназа (Е.К. 1.3.99.1.) отчетена е колориметрично, при 420 nm суцинат феруцианид-редуктазната активност (Минков, 1985).

2.1.2. Изучаване АТФ синтетазния (АТФазен) комплекс на биологичните мембрани при *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант:

- Изолуване на мембранна фракция:

Осъществено е чрез разрушаване на мицела в 0.32 M захароза, с помощта на кварцов пясък и електромеханична бъркалка (4000 об/мин), в режим от три цикъла по 15 min при 0 -4°C и двустепенно центрофугиране при 1000x g за 5 min и 5000x g за 20 min. (Beckman JA-20)

- **Разрушаване на спори** - на ултразвуков дезинтегратор тип UD-20 (Полша), при работна честота 22 ± 1.65 kHz, амплитуда 2-10 µm и експозиция 10 секунди, (работен режим 10 пъти x 10 секунди), на ледена баня (0 -4°C).

- Солюбилизиране на фактор F₁

За изолуване на ензима в разтворима форма бе използван метод на Pedersen et al., (Pedersen et al., 1984) в модификация (Минков, 1985).

- Определяне на АТФазна активност.

Общата АТФазна активност на протопласти, вегетативни мицели и спори, получени при различни условия на култивиране, е определяна по количеството на отделения неорганичен фосфат с модифициран метод на Fiske & Subarow (по Минков, 1986) и (или) по повишаването на концентрацията на водородните йони в реакционната среда (Shange & Nishimura, 1967).

- **Получаване на протопласти** - по метода на Norwood (Norwood, et al., 1985) в модификация на Нгуен (Нгуен, 1990)

2.1.3. Определяне на НАД⁺ киназна активност.

НАД⁺ киназна активност на диализирани безклетъчни екстракти от културите в динамика или в експоненциална фаза на растеж бе определена по образувания НАДФ в хода на ензимната реакция при 30°C, в 1 ml реакционна среда. Редуцирането на образувания НАДФ бе определено на спектрофотометрично при 340 nm (Кочетов, 1971) в ензимна реакция при участието на НАДФ специфична глюкозо-6-ф-дехидрогеназа (Serva) и изчислен съгласно формулата:

$$U = \frac{\Delta A_{340} \cdot 3n}{6.22}, \text{ където: } U - \text{количеството НАДФН}_2 (\text{nmol/h}), n - \text{разреждане}$$

6.22

ΔA₃₄₀ - изменението на плътност при 340 nm;
6.22 - µM екстинкционен коефициент на НАДФН₂

2.1.4. Определяне на екстрацелуларната протеазна активност

Определяна бе по метода на Kunitz (1946) при субстрат казеин (10 mg/ml). Една Kunitz единица се дефинира като количеството ензим, което при условията на протичане на реакцията предизвиква изменение на абсорбцията равно на 0,001.

Хидролизата на синтетичния субстрат N-бензоил-аргинин p-нитроанилид (БАПНА) беше определяна чрез спектрофотометрично измерване количеството на p-нитроанилида, освобождаван от него. Една ензимна единица се дефинира като 1 µM p-нитроанилид, отделен от 1 ml филтрат от културалната течност за 1 min.

3. Аналитични методи

3.1. Определяне на концентрацията на Ca^{2+} йони в културалната среда

Концентрацията на Ca^{2+} в културалната среда бе определяна колориметрично с О-крезол-фталейн и изчислявана в mmol/l по формулата:

$$\text{Калций (mmol/l)} = \frac{A_{578} \text{ пробата}}{A_{578} \text{ стандарт}} \times 2,50,$$

3.2. Количествено определяне на глюкоза - по метода на Dubois et al., (1956).

3.3. Количествено определяне на неорганичния фосфат - по метода на Weil-Malherbe (1951).

3.4. Определяне на вътреклетъчното съдържание на АТФ - спектрофотометрично при 340 nm, с готов тест на фирмата Boeringer Mannheim GmbH. Безклетъчните екстракти бяха предварително депротеинизирани с 0,6 N перхлорна киселина

3.5. Определяне на белтък - Белтъчното съдържание във филтратите от културалните течности и в безклетъчните екстракти бе определяно по метода на Lowry (Lowry, 1965), а в мембранната фракция по метода на Биурет (Северин & Соловьева, 1989).

3.7. Антибиотичната активност

Антибиотичната активност на филтрати от културална течност на *S. albobogriseolus* 444 и на етанолни екстракти от мицели бе определена по дифузионния метод срещу тест-микроорганизъм *B. subtilis* 6633 ATCC и изразявана в mm стерилна зона или в eg/ml по таблицата на Дмитриева (Егоров, 1965).

3.8. Полуакриламидна гел електрофореза - SDS - PAGE бе осъществена в 10% акриламиден гел; по метода на Laemmli (1970).

3.9. Хроматографски методи

- Охарактеризиране на протеолитичния комплекс, синтезиран от *S. albobogriseolus* 444 - с методите на високоефективната течна хроматография при следните условия:

- гел - филтрация - колона TSK 2000 SW (7,5 x 300) (Pharmacia LKB)(HPLC) с елуиращ буфер с pH 6,5 (0,05 M Na_2SO_4 , 0,02 M Na_2HPO_4)

- йонообменна хроматография - колона Моно Q (FPLC) буфер - 0,025 M Трис-HCl, pH 9 и 0,025 M Трис-HCl, pH 9 + 1M NaCl. Приложен бе линеен градиент.

- Охарактеризиране на мембранносвързана АТФаза от *S. albobogriseolus* 444 - 200 µl мембранна фракция са нанесени на колона Superose TM-12 (размери 0,5/300mm) и са елюирани с фосфатен буфер 0,05M, pH-7,4, при скорост на потока-0,4 ml/min. Активната фракция бе приложена вторично на колона МоноQ.

-Пречистване на НАД⁺ киназа: по метода на FPLC на колона "Shimadzu" модел LC 6A, тип TSK-6-3000SWG с размери 21,5/600 mm и елуиращ буфер Трис-HCl, 0,05M, pH=7,4.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

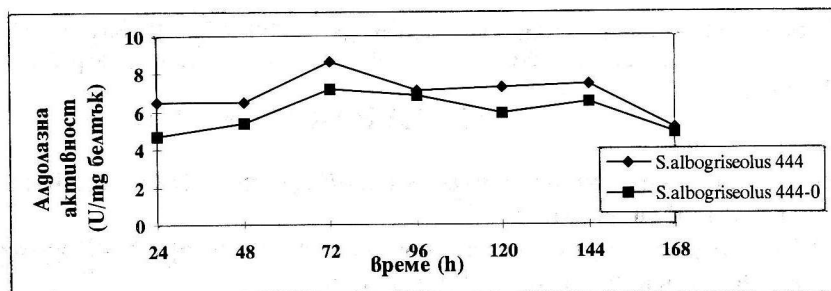
А. Ензими от общия метаболизъм на *S. albobogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант

1. Въглеродна обмяна и антибиотична синтеза при *S. albobogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

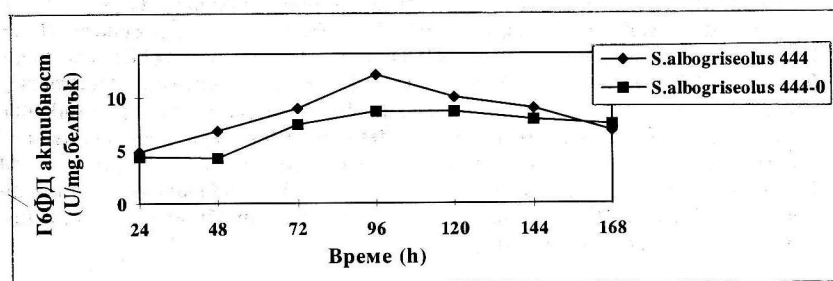
Като първи етап в нашата работа за изследване бяха подбрани някои ензими от въглеродния метаболизъм на *S. albobogriseolus* 444, участващи в различните катаболитни пътища: алдолаза (Е.К.4.1.2.13) и пируваткиназа (Е.К.2.7.1.40) от пътя на Ембден Майерхоф Парнас (ЕМП); сукцинат дехидрогеназа (СДХ) - (Е.К.1.3.99.1) и малатдехидрогеназа(МДХ)-(Е.К.1.1.1.38) от ЦТК; глюкозо-6-Ф-дехидрогеназа (Г6ФДХ)-(Е.К.1.1.1.49) от ПФ път и ензими, участващи в енергийната обмяна на клетката. Резултатите отразяващи динамиката на катаболитните ензими са съпоставени с тези, получени при нископродуктивния вариант на щам, отбелязан условно като *Streptomyces albobogriseolus* 444-0. Активността е проследена от 24 до 168 час на култивирането. Паралелно е отчетена натрупването на биомаса и синтезата на антибиотик в клетката на щам-продуцент и в културалната среда.

Активността на ензима алдолаза сравнително слабо варира по време на култивирането и на двата изследвани варианта (фиг.1). Като важен ензим в метаболизма, алдолазата проявява относително стабилна активност, докато активността на глюкозо-6ф-дехидрогеназата нараства в процеса на култивиране, с ясен пик на 96 час (фиг.2). Активността на Г6ФДХ се запазва висока до 120 час, което съвпада със стационарната фаза и активната синтеза на антибиотик. Активността на малат дехидрогеназата (МДХ) и сукцинат дехидрогеназата (СДХ) нараства почти 2 пъти в края на експоненциалната фаза и се задържа висока до 144 час при активния вариант на щам. При *S. albobogriseolus* 444-0 не се наблюдават отклонения от установената вече динамиката на МДХ (фиг.3). Прави впечатление по-късно изявяващия се максимум на СДХ, при нископродуктивния вариант и значително по-ниската СДХ активност до 120час от култивирането му (фиг. 4).

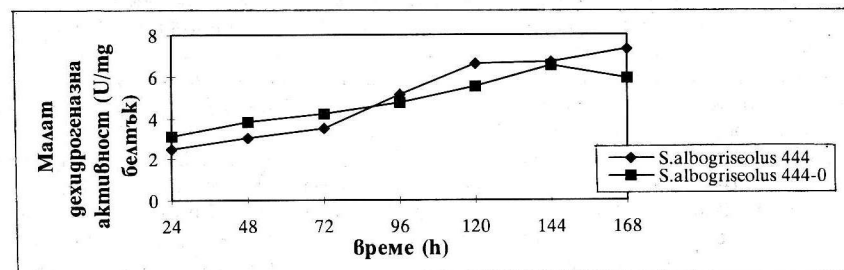
При развитие на *S. albobogriseolus* 444 в Минерална среда I по Гаузе (с глюкоза), пируват-киназата има най-висока активност по време на стационарната фаза (фиг.5). При неактивния вариант тя е около 2 пъти по-ниска и повишаване през стационарната фаза не се наблюдава. Активирането на определени ензими и катаболитни пътища се явява следствие от поддържане растежа на микроорганизмите във вариабелни условия, на базата на тясна координация между енергетичния и конструктивния метаболизъм и поддържане енергетичния заряд на клетката.



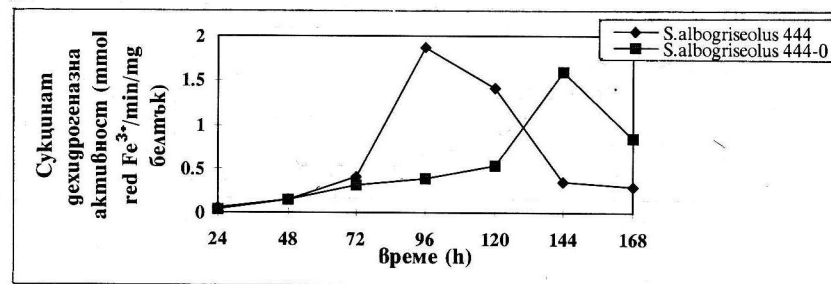
Фиг.1. Изменение в активността на ензима алдолаза в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.



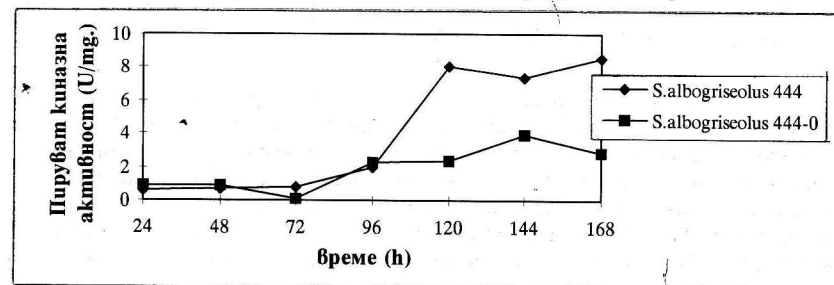
Фиг.2. Изменение в активността на ензима Г6Ф-дехидрогеназа в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.



Фиг.3. Изменение в динамиката на ензима малат дехидрогеназа в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.



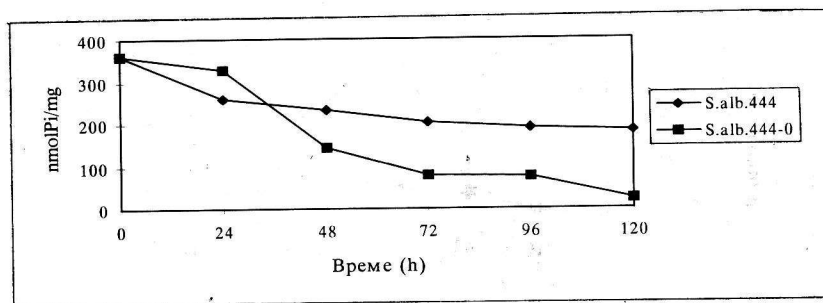
Фиг.4. Изменение в динамиката на ензима сукцинат дехидрогеназа в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.



Фиг.5. Изменение в активността на ензима пируват киназа в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

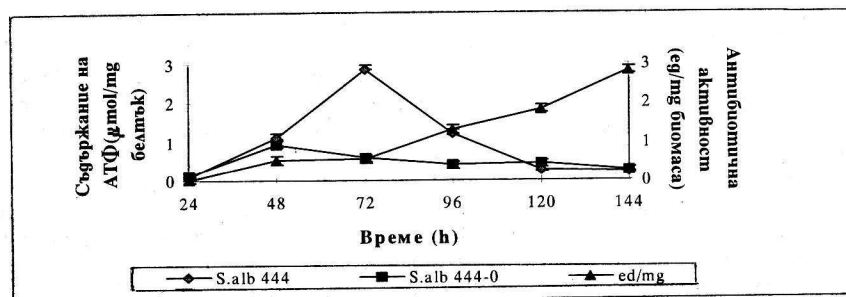
Енергетичният статус на клетката е тясно свързан както с въглеродната, така и с фосфатната обмяна. Като алостеричен регулатор фосфатът потиска активността на фосфофруктокиназата - ключов ензим от гликолизата и глюкозо-6ф-дехидрогеназата и повлиява съотношението на молекулите глюкоза, които встъпват в единия или другия метаболитен път. В тази връзка изследвахме сравнително усвояването на фосфатите от *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант, а също така и повлияването му от екзогенно добавен в средата, преди началото на ферментацията, нигерицин. От фиг.6 се вижда, че нископродуктивният вариант усвоява по-пълно фосфата.

На 96 час от култивирането на *S. albogriseolus* 444, паралелно с натрупването на антибиотик, подчертано се забавя усвояването на фосфатите. Тогава е регистриран и максимум в активността на Г6ФДХ (фиг.2). Екзогенно добавеният нигерицин забавя изчерпването на фосфата при култивиране на *S. albogriseolus* 444 и на неговия нископродуктивен вариант ясно изразено при високите концентрации антибиотик (50-100µg/ml) (данните не са показани). Можем да допуснем, че със засилването на антибиотичната синтеза при *S. albogriseolus* 444 се забавя усвояването на фосфата от средата под въздействието на собствено-продуцирания антибиотик с цел да се поддържа необходимата лимитираща концентрация в клетката на продуцента.



Фиг.6. Усвояване на неорганичния фосфат от култури на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант. Количественото определяне на фосфата в средата е осъществено по метода на Weil - Malherbe (1951).

Под каква форма фосфатът, усвоен от средата, се включва във вътреклетъчната обмяна? Възможна форма на вътреклетъчни съединения с регулаторно действие са фосфорилираните нуклеотиди (в частност АТФ). Съотношението между нивото на антибиотичната синтеза и количеството на АТФ не е изучено при биосинтезата на политемни антибиотици. Затова изследвахме нивото на вътреклетъчното съдържание на АТФ в зависимост от биосинтезата на антибиотик и растежната фаза на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант (фиг.7).



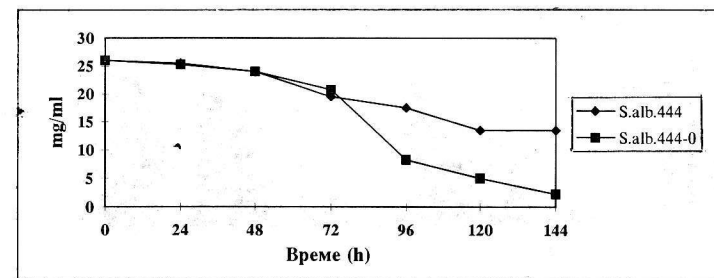
Фиг.7. Динамика във вътреклетъчното ниво на АТФ в клетките на нископродуктивния вариант *S. albogriseolus* 444-0 и щам- продуцент *S. albogriseolus* 444 в процеса на антибиотична синтеза.

Наблюдавано бе по-високо съдържание на АТФ при младите култури и на двата варианта (48 час от началото на култивирането). Като цяло нивото на АТФ е по-високо при *S. albogriseolus* 444. Понижаването на съдържанието на АТФ при активния вариант се извършва на фона на засилваща се антибиотична синтеза. Подобна динамика при нископродуктивния вариант не бе наблюдавана. Твърде вероятно е освен като макроергично съединение АТФ да се явява вътреклетъчен ефектор, който има отношение и към антибиотичната синтеза. Силното

намаляване на вътреклетъчното съдържание на АТФ (на 96 h.) при *S. albogriseolus* 444, може да е свързано с активирането на антибиотик - модифициращите ензими на щам. Най- вероятно концентрацията на АТФ се явява ефектор на определени ензими, но под контрола на друг основен регулаторен параметър- енергетичния заряд на клетката.

В тази връзка, нерешен е въпросът за енергозависимостта на синтезата на полиетерния антибиотик още повече, че са наблюдавани различия в усвояването на глюкозата при двата варианта (фиг. 8).

Подобно на други стрептомицетни щамове и при *S. albogriseolus* 444 е необходимо да се установи определено съотношение между активността на катаболитните ензими, осъществяващи разграждането на въглехидратите по ПФПът или по ЕМП пътя.



Фиг.8. Усвояване на глюкоза в процеса на култивиране на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант. Глюкозата е определена количествено по метода на Duboi (1956).

В тази връзка, като следващ етап в нашата работа, изследвахме ензима НАД⁺киназа (Е.К. 2.7.1.23 АТФ:НАД⁺-2 фосфотрансфераза), координиращ различните анаболитни и катаболитни процеси в клетката.

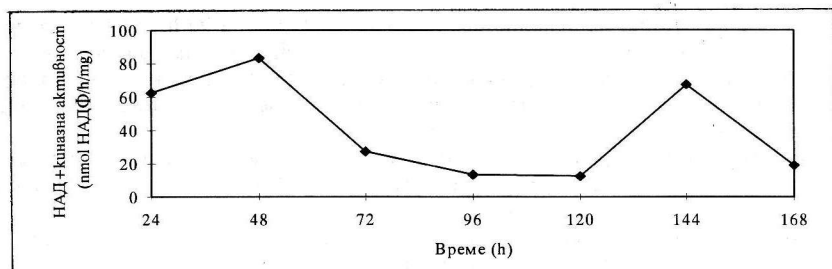
2. НАД⁺киназа

НАД⁺киназата директно повлиява нивото НАД⁺/НАДФ⁺, катализирайки фосфорилирането на НАД⁺ чрез терминалната фосфорна група от АТФ. В литературата отсъствуват данни за този важен ензим при стрептомицети. Не е проучена ролята му в биосинтезата на вторични метаболити.

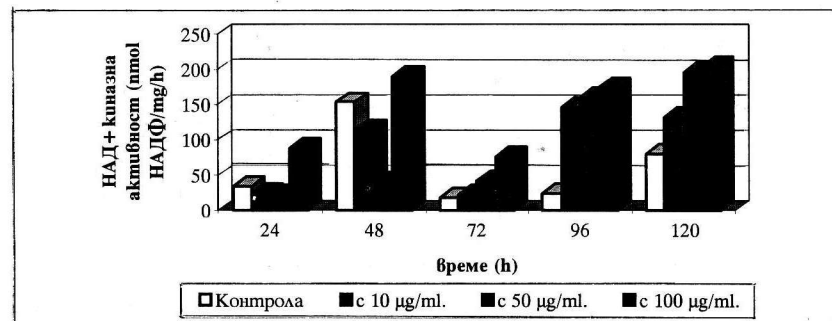
2.1. Изменение в НАД⁺киназната активност в процеса на растеж и антибиотична синтеза при *S. albogriseolus* 444.

Динамиката на НАД⁺киназната активност на култура *S. albogriseolus* 444 в течна хранителна среда Гаузе, от 24 до 168 час е представена на фигура 9.

Наблюдават се два ясно обособени пика- на 48 час, в експоненциалната фаза и в късната стационарна фаза- на 144 ч. Екзогенно добавен в средата нигерицин (основен компонент на антибиотичния комплекс на щам) преди началото на култивирането, има стимулиращ ефект върху НАД⁺киназната активност, изразен в края на експоненциалната и стационарната фази (фиг.10). Нигерицинът в концентрация от 100 μg/ml стимулира активността на ензима при всичките изследвани етапи. В същото време антибиотикът потиска натрупването на биомаса на щам-продуцент.



Фиг.9. Динамика на НАДкиназната активност в процеса на развитие на *S. albogriseolus* 444 в хранителна среда Гаузе 1.



Фиг.10. Ефект на екзогенно добавен нигерицин върху НАД⁺киназната активност на *S. albogriseolus* 444.

Високата НАД⁺ киназна активност по време на експоненциалния растеж предполага активна синтеза на НАДФ, който е важен кофактор, участващ в различни вътреклетъчни процеси. Последваното активиране на Г6ФД вероятно не е случайно, тъй като то позволява "рециклирането" на НАДФ⁺ до съответната редуцирана форма и подсказва вероятната роля НАД⁺ киназата в регулиране усвояването на глюкозата по пентозо-фосфатния път и в синтезата на НАДФ.Н, необходим за анаболичните процеси.

2.2.Изолиране и частично характеризирание на НАД⁺ киназа от *S. albogriseolus* 444.

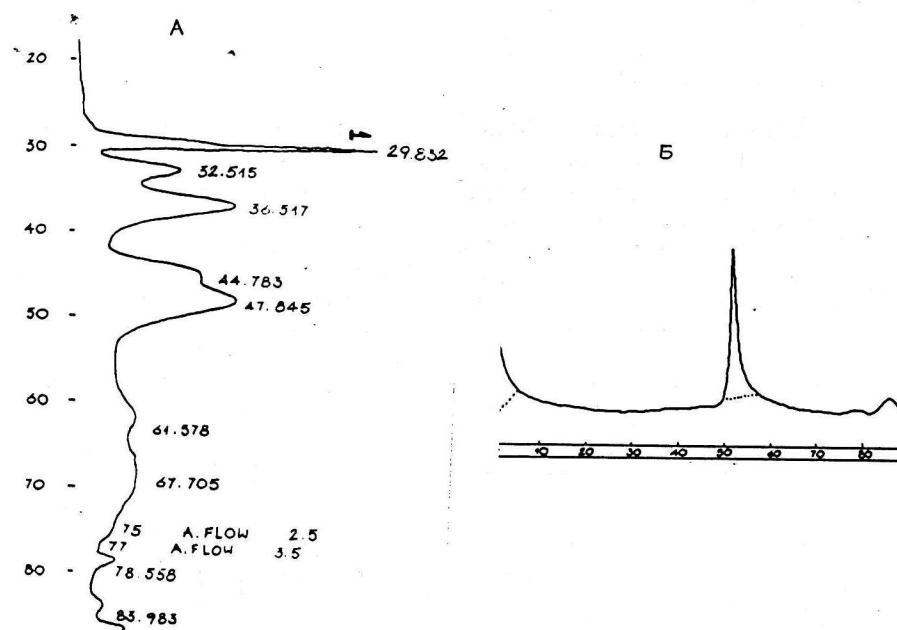
Литературните данни за локализацията на НАД⁺киназата в субклетъчните структури са противоречиви (Muto, 1981; Butler, 1982). Затова в серия от предварителни опити бяха подбрани условията за центрофугиране и субклетъчно фракциониране на хомогената от мицели на *S.albogriseolus* 444. Най-висока активност бе измерена в безклетъчните екстракти, получени след двустепенно центрофугиране и отделяне на мембранната фракция, което предполага, че НАД⁺киназата е съсредоточена в цитозола.

Изследвахме зависимостта на активността на НАД⁺киназа от *S. albogriseolus* 444 от рН, температурата както и отношението Mg²⁺/АТФ в реакционната

среда. Установеният температурен оптимум за осъществяване на ензимната реакция при *S. albogriseolus* 444 е 28 - 30°C. От проверените три буферни системи (Трис-НСl буфер, фосфатен и Глицил-глицинови буфери) най-добри резултати са получени с Трис-НСl буфер, 0.1 М. Подобно на НАД⁺киназите от други микроорганизми ензимът е по-активен в алкалната област рН-8.3.

Опитно установените оптимални параметри за осъществяване на ензимната реакция, бяха съблюдавани при всички опити за изолиране и характеризиране на НАД⁺киназата.

Поради мицелния строеж на стрептомицетите беше разработена и собствена схема за очистка на НАД⁺ киназа от *S. albogriseolus* 444, осъществена в 4 етапа: получаване на безклетъчни екстракти; температурно фракциониране, фракционно утаяване с амониев сулфат и хроматографско разделяне. Полученият преципитат след 50% насищане с амониев сулфат, е ресуспендиран в Трис-НСl буфер (0,1 М, рН 8.3), диализиран 1 нощ срещу същия буфер и приложен на гел-филтрационна колона TSK-6-3000-SWG. Резултатите от разделянето са представени на фиг.11 и таблица 1.



Фиг.11. Хроматографско разделяне (FPLC) на безклетъчни диализирани екстракти от *S. albogriseolus* 444 (А) и рехроматографиране на активната фракция (пик 1).

Установени са над 10 пика, при УВ детектор -280 nm. Активната белтъчна фракция (пик 1), събрана и концентрирана на Amicon филтър бе използвана за вторична гел-филтрация на колона TSK-6-3000-SWG. След пълното елюиране бе

наблюдаван един почти хомогенен ясно изразен пик. (фиг.11) Той има молекулна маса 141 219 D., определена с ВЕТХ, след стандартизиране на колоната.

Наличие на изоформи на ензима, които се разглеждат и като биохимични маркери за различните растежни фази, не бяха открити с предложения метод за пречистване.

Таблица 1.

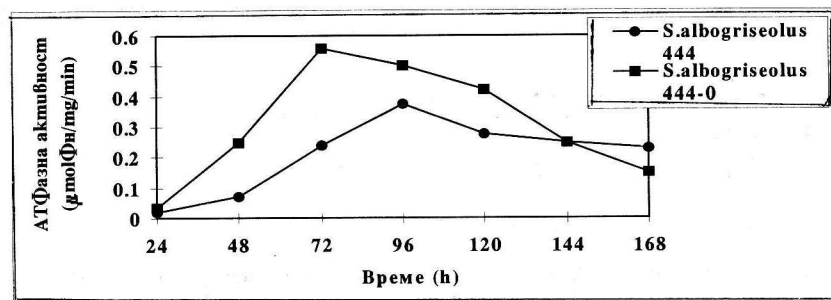
Очистка на НАД⁺киназа, изолирана от *S. albogriseolus* 444

Етап на пречистване	Общ белтък (mg)	Обща активност (nmol НАДФ/ч)	Специфична активност (nmol НАДФ/ч /mg)	Добив %	Степен на пречистване
Безклетъчни екстракти	653	26511	40.6	100	1
Температурно фракциониране	580	31548	54.39	84	1.12
Преципитация с (NH ₄) ₂ SO ₄ (50%)	2.036	416	204.3	1.15	3.2
FPLC	0.038	2.35	62.1	0.33	53.1

3. АТФсинтетазен (АТФазен) комплекс при *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

3.1. Динамика на общата АТФазна активност, в процеса на растеж и диференциация на щам *S. albogriseolus* 444.

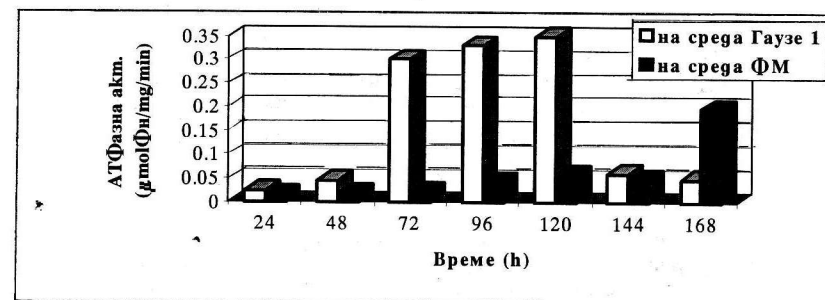
Мембранно-свързаните, H⁺ пренасящи АТФази са протонни помпи, които играят централна роля в биоенергетиката на живите организми. F₀F₁ тип АТФаза, изолирана от *Streptomyces lividans* е частично характеризирана (Hensel et al., 1991), но в литературата отсъствуват данни за участието на този важен ензим в различните физиологични процеси, диференциацията и растежа на стрептомицети. Ето защо изследвахме АТФазната активност в процеса на диференциация на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.



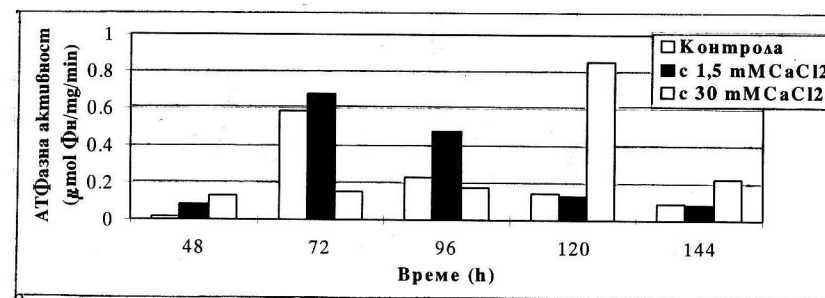
Фиг.12. АТФазна активност на вегетативни мицели от *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант. Активността е измерена по модифициран метод на Fiske & Subarow (Минков, 1986).

На фиг.12, е представена промяната в АТФазната активност на вегетативни мицели, получени при дълбочинно култивиране в Минерална среда I по Гаузе от 24 до 168 час. При *S. albogriseolus* 444-0 е измерена по-висока АТФазна активност спрямо продуциращия вариант, без обаче динамиката да се различава при култивиране в едни и същи условия (фиг.12).

АТФазната активност бе проследена и при култивиране на щама в богата по състав хранителна среда FM, в която се осигурява висока скорост на растеж, и се потиска ранното образуване на антибиотичния комплекс. Резултатите са представени на фиг.13.



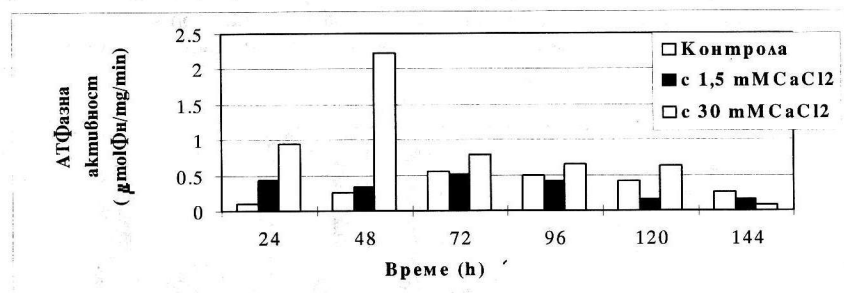
Фиг. 13. Промяна в АТФазната активност на *S. albogriseolus* 444 при дълбочинно култивиране в различни хранителни среди.



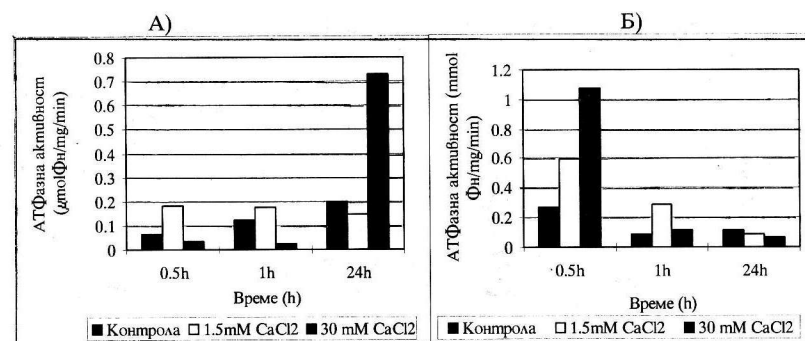
Фиг.14. Ефект на калциевите йони върху общата АТФазна активност при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444 в Минерална среда I по Гаузе (контрола) и в Минерална среда I с добавени 1.5mM и 30 mM CaCl₂.

Следвайки етапите от естествения жизнен цикъл на стрептомицетите, измерихме АТФазна активност на спори, получени на агарова Минерална среда 1 по Гаузе, след 14 днешно култивиране и на дълбочинни спори, получени в среда FM в условията на гладуване (няколко паралелни опита - съответно в среда FM без фосфат, без пептон и с добавен CaCl₂). Въздушните спори притежават много по-ниска АТФазна активност в сравнение с тази на мицели. Дълбочинните и въздушните спори, получени на среда FM след 14 днешно култивиране, в присъствие на 30 mM Ca²⁺ се отличават с по-висока АТФазна активност.

Калциевите йони (в концентрация 1.5 mM и 30mM) променят общата АТФазна активност и при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444 на Минерална среда I по Гаузе (фиг.14). При слабопродуктивния вариант на щам калциевите йони също оказват стимулиращ ефект върху общата АТФазна активност, най-ясно изразен в експоненциалната фаза (фиг.15).



Фиг.15. Ефект на калциевите йони върху общата АТФазна активност при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444-0 в Минерална среда I по Гаузе (контрола) и в Минерална среда I с добавени 1.5mM и 30 mM CaCl₂.



Фиг.16. АТФазна активност при *S. albogriseolus* 444 (А) и неговия нископродуктивен вариант (Б), в условията на лимитиран растеж в среда FM (с добавен 1.5 mM и 30mM CaCl₂). Опитът бе осъществен с експоненциални (48 h) култури на щам.

За да изясним ефекта на различните концентрации на калциевите йони проведохме следния допълнителен експеримент: добре развити 48 часови култури на *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант, бяха пренесени в Минерална среда I по Гаузе, в която е добавено съответно 1.5mM и 30 mM CaCl₂ или в условията на гладуване по фосфат или глюкоза. Физиологичният отговор на щамове на 30 мин, 60 мин и 24 час, при създадените опитни условия е представен на фиг.16. Още на 30 минута е регистрирана 3 пъти по-висока АТФазна активност,

в присъствието на калциев йони (1.5 mM) (фиг. 16А). При *S. albogriseolus* 444-0 стимулирането на 30-та минута, е по-добре изразено при високото съдържание на Ca²⁺ (фиг 16 Б). И при двата варианта на щам отсъствието на фосфат в средата инхибира АТФазната активност.

Трябва да отбележим, че измерената висока АТФазна активност в присъствие на Ca²⁺ йони е нечувствителна по отношение на класическия инхибитор за АТФази от F₀F₁ тип - олигомицин.

3.2.Характеристика на мембранносвързана АТФаза изолирана от *S.albogriseolus* 444

В опитите по изолиране и характеризиране на мембранносвързана АТФаза от *S.albogriseolus* 444 бе използвана обозначената като груба или непречистена мембранна фракция, получена с разработената за целта методика за разрушаване мицелите от стрептомицети. Хидролизата на АТФ, осъществена от непречистената мембранна фракция беше регистрирана по два различни метода:

-По промяната в концентрацията на неорганичен Фн .

-По промяната в концентрацията на (H⁺) йони

Разрушаването на мицела с помощта на кварцов пясък може да предизвика силно нарушаване в целостта на клетъчната мембрана. По тази причина в експерименталната ни работа бяха проведени опити за изолиране на протопласти от клетки на стрептомицетен щам 444. Протопластите бяха получени от мицел, култивиран 48 часа в YEME (Norwood, 1985), по оптимизиран за нашия щам вариант на метода на Norwood (Norwood, 1985). Проследена беше хидролазната активност на нативни протопласти и на протопласти, подложени на осмотичен шок.(табл.2.)

Таблица 2.

АТФазна активност на протопласти, получени от 48 часова култура на *S. albogriseolus* 444

Проба	Метод на регистриране	АТФазна активност	АТФазна активност в присъствието на 5μM олигомицин
Нативни протопласти	По промяна концентрацията на H ⁺ йони	0.009 μg(H ⁺)/mg/min	0.006 μg(H ⁺)/mg/min
Нативни протопласти	По промяната на Фн в реакционната. среда	0.045 μmolФн/mg/min	0.036 μmol Фн/mg/min
Протопласти след осмотичен шок	По промяната на Фн в реакционната. среда	0.018 μmolФн/mg/min	0.008 μmol Фн/mg/min

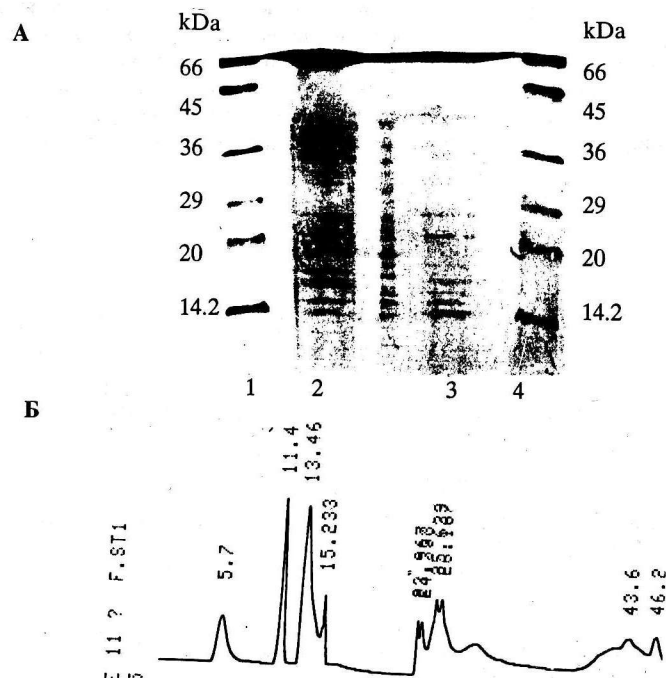
АТФазната активност на протопластите е значително по-ниска от тази на мембранната фракция и се инхибира непълно от олигомицин.

Опити да се получат протопласти, чиято АТФазна активност да се стимулира от разпращащи агенти бяха неуспешни. При всички измервания получените протопласти притежаваха активност, която не се стимулира от FCCP. Затова по-нататъшните изследвания продължихме с грубата мембранна

фракция. Установихме, че грубата мембранна фракция, получена от *S. albogriseolus* 444 притежава АТФазна активност, която непълно се инхибира от антибиотика олигомицин. Повишаването на концентрацията на олигомицина не променя степента на инхибирането. Паралелно с това АТФазната активност на изследвания стрептомицетен щам проявява също непълна чувствителност по отношение на друг инхибитор на преноса на водородни йони-циклохексил карбодиимид (DCCD). Едновременно добавяне на олигомицин и DCCD в реакционната среда не променя съществено характера на инхибирането.

В по-нататъшната ни работа бяха проведени експерименти за получаване на ензима в разтворима форма. В основата на използвания от нас метод е поставена възможността за солубилизиране (привеждане в разтворима форма) на фактор F_1 , описана от Pedersen (Pedersen et al., 1984). Изолирането е осъществено в присъствие на високи концентрации АТФ и ЕДТА за да се предпази ензима от инактивиране.

Проведените електрофоретични изследвания на препарата, получен след обработка с флороформ, идентифицираха 12 различни белтъка, 5 от които са с молекулно тегло, съответстващо на молекулните маси на субединиците на F_1 ($\alpha=60000$, $\beta=45000$, $\gamma=20-29000$, $\delta=15000$, $\epsilon=12000$ Da).



Фиг. 17. SDS - PAGE (10% по Laemmli, 1970) (А) и хроматографско разделяне (Б) на непречистена разтворима АТФаза от *S. albogriseolus* 444, получена след солубилизация с хлороформ

(1 и 4 - белтъчни маркери; 2-мембранна фракция; 3-солубилизиран F_1 комплекс)

Получените резултати по метода на SDS-PAGE и HPLC анализ (фиг.17), показват, че изолираната разтворима фракция е относително чиста и може да се използва за по-нататъшно пречистване.

За допълнителна идентификация на получената разтворима фракция беше изследвано влиянието на класическия инхибитор на активността на фактор F_1 - На азид. Наличието на 100 μ M азид в реакционната среда води до силно инхибиране на АТФазната активност при *Streptomyces albogriseolus*.

С цел получаване на по-големи количества от F_1 бяха въведени допълнителни стадии на очистка след солубилизацията. Стандартната схема, включваща етап на изсолване с амониев сулфат не даде очакваните резултати (табл.3.)

Таблица 3.

Изолиране и очистка на разтворима АТФаза от *S.albogriseolus* 444

Проба	Обем (ml)	Белтък (mg/ml)	Общ белтък (mg)	Специф. акт. (μ molP _i /mg/ml)	Обща акт.	Степен на пречистване	Добив
мембр.фр.	8	37	296	0.015	4.44	1	100
F_1	6.9	4.2	22.9	0.037	1.069	2.46	24
F_1 след нагряване	6.9	3.8	26.2	0.048	1.25	3.2	27
F_1 след изсолване	0.5	2.8	1.4	0.1	0.14	6.62	3.1

Изолираната от нас разтворима форма на ензима е стабилна при стайна температура. При 0 - 4 ° C за 1 час тя се инактивира 100%. Същият ефект имат и по-ниските температури. След 4 часа съхранение при -20 ° C инактивирането е пълно и необратимо. Това бе наблюдавано и по отношение на разтворимата форма на ензима, изолирана от ниско-продуктивния вариант на щам.

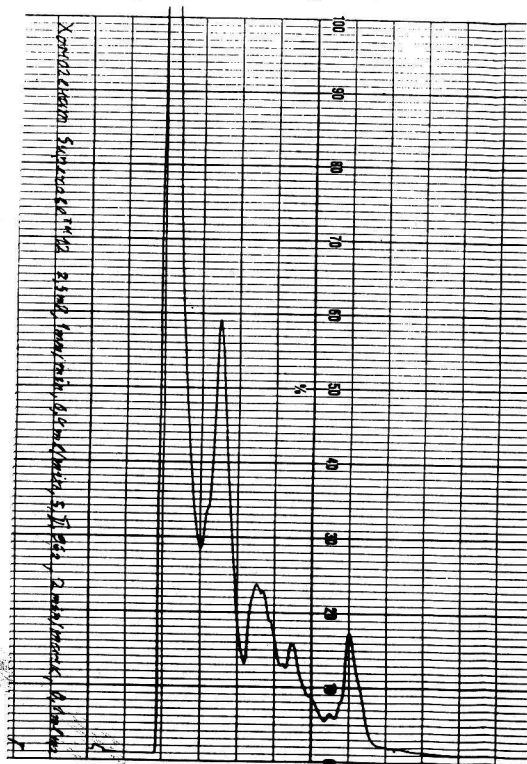
Най-висока хидролазна активност на изолираната водноразтворима фракция (F_1) бе измерена в температурния интервал 25-28°C в Трис-НСl буфер, 0.025M с рН=7.5. При тези условия Константата на Михаелис-Ментен за сродство към субстрата (MgАТФ) е 0.52 mM, изчислена по метода на Лайнуевър и Бърк.

Мембранно-свързаният АТФазен комплекс от *S. albogriseolus* 444 в присъствието на АТФ като субстрат на ензимната реакция, проявява ниска специфичност към двувалентните йони. Магнезиевите йони могат да се заменят с калциеви, но изследваната обща АТФазна активност се понижава в реакционна среда с калциеви йони. Едновременно с това се изменя и чувствителността към олигомицин. В присъствие на калций, АТФазната активност не се повлиява от този класически инхибитор (резултатите не са показани).

Общата АТФазна активност е най-висока в присъствие на 2.5 mM MgCl₂, измерена в Трис-НСl буфер, рН=7.5 и субстрат - 1 mM АТФ. При същите условия, оптималната концентрация за калциевите йони е 2.5 mM. Подобна зависимост от магнезиевите йони наблюдавахме и по отношение на изолирания с хлороформ, от грубата мембранна фракция, F_1 комплекс. Другите изследвани от нас йони (K⁺, Na⁺, Zn²⁺, Mn²⁺), по-слабо повлияват АТФ-хидролазната активност в сравнение с Ca²⁺ и Mg²⁺ и нямат стимулиращ ефект. Ефектът на натриевите йони не се

променя под въздействието на съпътстващия анион. Амониевите йони, известни като стимулатор на H^+ АТФази при растения и дрожди не оказват подобно действие при мембранно свързана АТФаза от *S. albogriseolus* 444.

Следващ етап от нашата работа бе хроматографско разделяне на мембранната фракция, получена от *S. albogriseolus* 444, с помощта на гел-филтрационна колона Superose TM-12 при условията, посочени в раздел "Материали и методи". Получените резултати от разделянето са представени на фиг. 18. Отделните пикове бяха събрани и измерена АТФазната активност (табл.4). Такава бе отчетена само при пик 4 и 5. Като при пик 4 тя е олигомицин чувствителна (табл.5). Поради изолирането на две активни фракции се опитахме да ги охарактеризираме допълнително чрез инхибиторен анализ с олигомицин, в присъствието на калциев или магнезиеви йони. Резултатите са представени на табл.5. По-висока АТФазна активност проявява фракция 4 като в среда съдържаща 2.5 mM Mg^{2+} тя напълно се инхибира от добавения олигомицин (250 $\mu g/ml$). Обозначената като фракция 5 проба е олигомицин чувствителна само в присъствие на Ca^{2+} . Тези данни ни позволяват да допуснем наличието на калций и магнезий-зависима АТФаза в мембраните на *S.albogriseolus* 444.



Фиг.18. Хроматографско разделяне на мембранна фракция от *S. albogriseolus* 444

Таблица 4.

Разпределение на белтъка и активността при хроматографско разделяне (FPLC) на мембранната фракция от *S.albogriseolus* 444. Активността е измерена по метода на Shange & Nishimura, (1967)

Проба	Обем (ml)	Белтък (mg/ml)	Общ белтък (mg)	Специф. акт. ($\mu gH^+/mg/min$)	Обща акт.	Степен на пречиставане	Добив (%)
мембр. фр.	10	3	30	0.087	2.61	1	100
акт.фр.4	0.3	0.07	0.021	4.76	0.098	54.7	3.79
акт.фр.5	0.3	0.069	0.0207	1.78	0.038	20.4	1.45

Таблица 5.

АТФазна активност на активните белтъчни фракции получени след гел-филтрация на непречистена мембранна фракция, измерена в присъствието на Mg^{2+} и Ca^{2+} по метода на Shange & Nishimura, (1967)

Проба	АТФазна акт (в среда с Mg^{2+})	с олигомицин (250 $\mu g/ml$)	АТФазна акт (в среда с Ca^{2+})	с олигомицин (250 $\mu g/ml$)
акт.фракция 4	1.33	0	2.48	1.24
акт.фракция 5	0.79	0.68	3.0	0.0

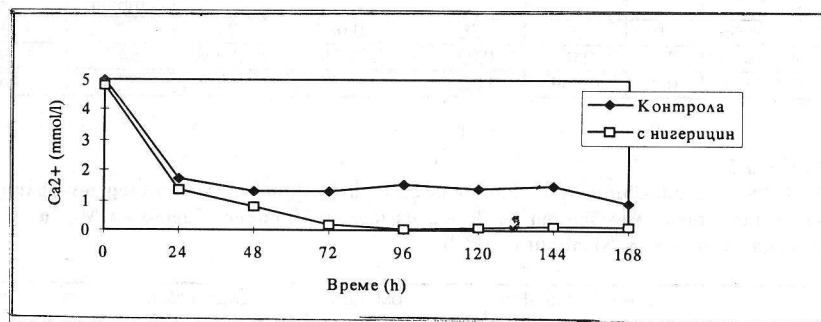
Б. Калциевите йони като фактор за морфо-физиологичната и биохимична диференциация на щам *S. albogriseolus* 444 и неговия слабопродуктивен вариант.

1. Влияние на калциевите йони върху растежа на *S.albogriseolus* 444 и неговия слабопродуктивен вариант.

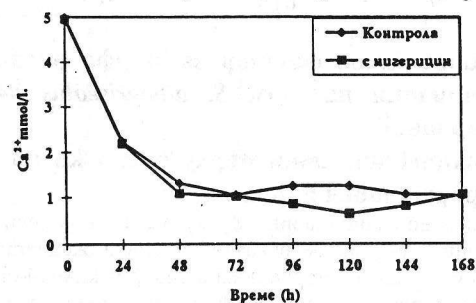
Калциевите йони оказват силно влияние върху жизнената дейност на различни микроорганизми. Последните години бе изказано предположението за участие на калциевите йони в спорулацията на стрептомицети и в калций-опосредстваната регулация на базата откритите и при прокариоти калций-зависими белтъци. Затова като начало бе интересно да проследим развитието на щам-продуцент *S. albogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант в присъствие на различни концентрации калциев йони. Проследявайки растежа на *S. albogriseolus* 444 и *S. albogriseolus* 444-0, в модифицирана Минерална среда 1 по Гаузе (с глюкоза), в присъствие на Ca^{2+} в концентрация 1,5 и 30 mM установихме, че калциевите йони забавят натрупването на биомаса от двата варианта на щам. В отсъствието на калциев йони щамът натрупва активно биомаса след 72 h. В среда с калций този процес е отместен във времето. Калциевите йони, обаче не оказват значително влияние върху антибиотичната активност на щам-продуцент.

Преди да изследваме други аспекти от влиянието на калциевите йони, проследихме как се усвоява калцият от културите на двата варианта (активен и неактивен щам) (фиг.19 и фиг.20). Рязко намаляване на концентрацията на Ca^{2+} се наблюдава през първите 24 h от култивирането на щамовете, след което нивото

му в хранителната среда се запазва почти не се променя. В присъствие на антибиотик изчерпването на Ca^{2+} от средата е почти пълно при продуцираща щам. Възможно е изчерпването на Ca^{2+} от средата да е свързано с образуването на дълбочинни спори от културата. Направените от нас микроскопски наблюдения потвърдиха формирането от щам на дълбочинни спори още на 72 h в присъствието на 30 mM Ca^{2+} . При неактивния вариант калциевите йони предизвикват нетипичен, зърнист растеж на мицела в течната култура.



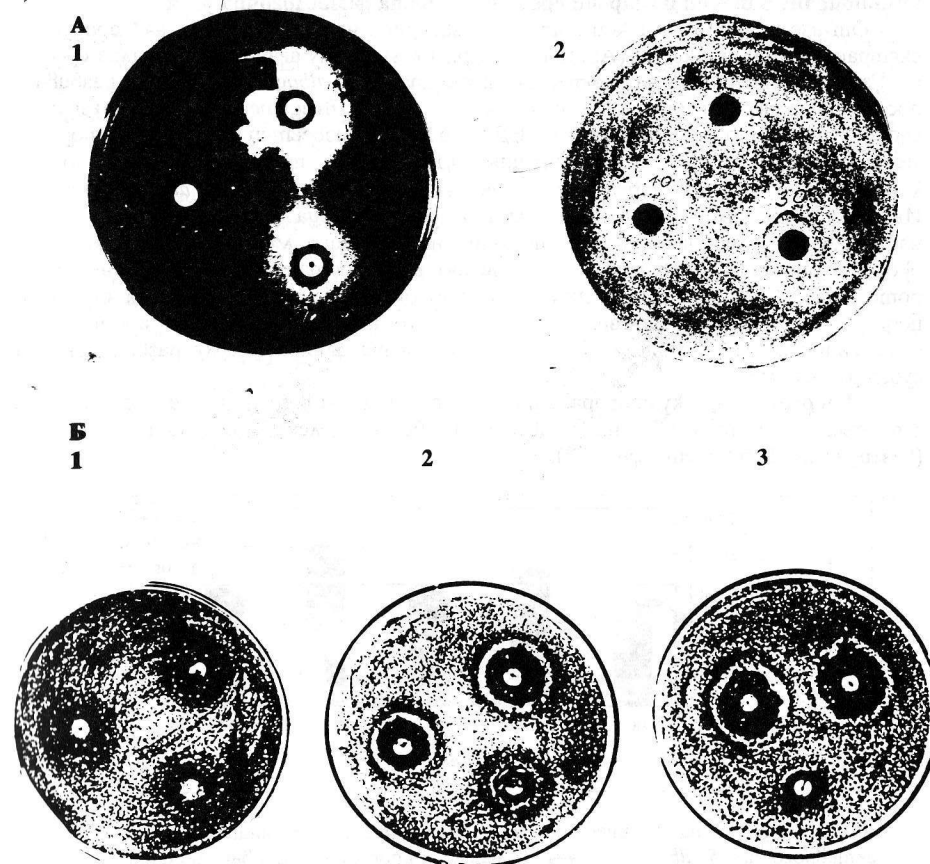
Фиг. 19. Влияние на екзогенно добавен нигерицин върху усвояването на калциевите йони при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444 в среда Гаузе 1.



Фиг. 20. Влияние на екзогенно добавен нигерицин върху усвояването на калциевите йони при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444-0 в среда Гаузе 1.

Следващият етап от нашите изследвания също доказва активното участие на Ca^{2+} и антибиотика в процесите на диференциация, осъществявани в стрептомицетната клетка. Калциевите йони в концентрация от 5, 10 и 30 mM стимулират образуването на въздушен мицел при култивиране на *S. albogriseolus* 444 на агарова среда ISP₂ и Минерална среда 1 по Гаузе, както и процеса на спорулация и при двата варианта на щама (фиг 21). ЕГТА, добавен към среда в концентрации 2 и 5 μmol/gusck, сменя наблюдавания ефект на калциевите йони. Също така установихме, че добавянето на антибиотика нигерицин в ниски концентрации (1, 5, 10, 50, 100 μg/gusck) към култивационната среда индуцира формирането на въздушен

мицел. Този ефект е по-ясно изразен при нископродуктивния вариант на щама. От друга страна нигерицинът показва по-силен индуциращ ефект в присъствието на Ca^{2+} .



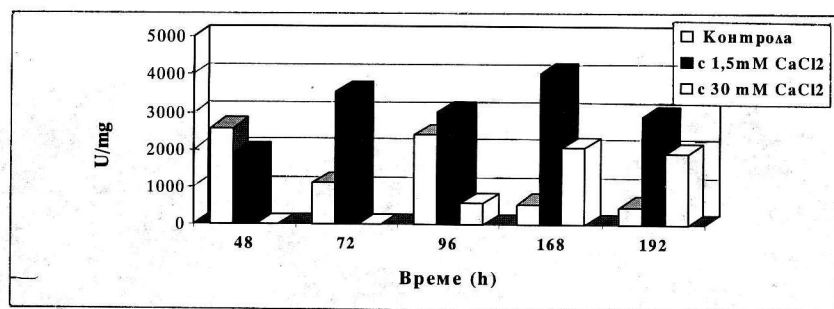
Фиг.21. Ефект на калциевите йони върху морфологичната диференциация на *S. albogriseolus* 444 (А) и неговия нископродуктивен вариант (Б), култивирани на агарови среди ISP₂ (А₁) и Минерална среда 1 по Гаузе (А₂ и Б). Калцият е добавен в концентрации 5, 10 и 30 mM (в ямки или на филтърни дискчета както следва: 1 - с 5 mM Ca^{2+} ; 2 - с 10 mM Ca^{2+} ; 3 - с 30 mM Ca^{2+}).

2. Ефект на калциевите йони върху екстрацелуларните протеази продуцирани от *S. albobogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

2.1. Екстрацелуларни протеази, продуцирани от *S. albobogriseolus* 444 при култивиране в течни и агарови среди и тяхната физиологична роля.

От изследвания на някои автори е известно, че *S. albobogriseolus* 444 продуцира екстрацелуларни протеази (Антонова и др., 1988). Върху агарова Минерална среда 1 по Гаузе, в отсъствие на протеазни инхибитори, *S. albobogriseolus* 444 се развива с последователно формиране на субстратен мицел, въздушен мицел и въздушни спори. Изследвано бе влиянието на ЕДТА и ЕГТА (известни като инхибитори на металопротеази) в концентрация 0,1 mM и трипсинов инхибитор в концентрация 1 µg/ml върху процесите на диференциация на *S. albobogriseolus* 444. Инхибиторите бяха поставяни в ямки в агаровата среда. В тяхно присъствие бе наблюдавано инхибиране на формирането на въздушен мицел и въздушни спори около зоната на добавянето. Развитието на субстратния мицел обаче не се потискаше. Това предполага синтезирането от *S. albobogriseolus* 444 на трипсин-подобни и металопротеази, а така също и роля на тези протеази в диференцирането на мицела. Те не оказват обаче влияние върху развитието на субстратния мицел.

При дълбочинно култивиране на *S. albobogriseolus* 444 в среда Гаузе 1 (с глюкоза), в присъствие и отсъствие на калциев йони бе определена тоталната протеазна (казеинова) активност (фиг. 22).



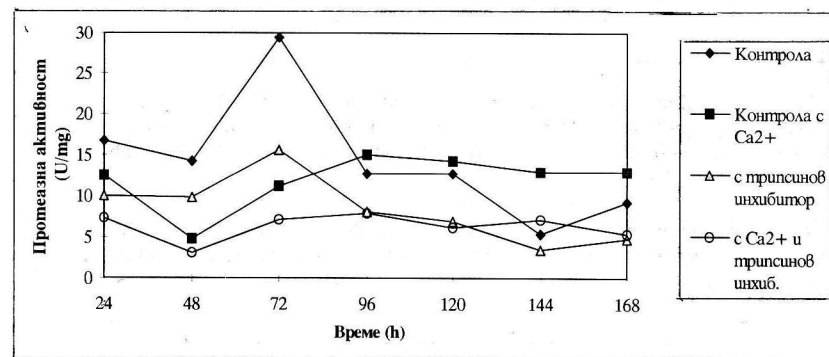
Фиг.22. Ефект на калциевите йони върху протеолитичната (казеинолитична) активност при *S. albobogriseolus* 444. Тоталната протеазна активност бе определена по метода на Kunitz (1946).

Най-висока тази активност е на 48 и 96 h от развитието на културата (в отсъствие на Ca^{2+}), като ферментационната среда не съдържа субстрат на протеазите. Калцият в концентрация 1,5 mM стимулира протеазната активност на щама след 48 h от култивирането му. Вижда се, че концентрация на калций от 30 mM потиска почти напълно протеазната активност до началото на стационарната фаза. Възможно е този ефект на калция да е свързан с неговото влияние върху диференциацията на културата. В литературата съществуват данни за стимулиращ ефект на калция (в определени концентрации) върху протеазната активност, който се обяснява със стабилизиращото му действие върху активността на сериновите протеази (Gibb & Strohl, 1988).

2.1. Характеристика на екстрацелуларните протеази, продуцирани от *S. albobogriseolus* 444 в течни култури.

Характеристиката на екстрацелуларните протеази, продуцирани от щама в среда, несъдържаща субстрат на тези ензими бе установена чрез определянето на субстратната им специфичност и техния отговор на различни протеазни инхибитори. Екстрацелуларните протеази, продуцирани от *S. albobogriseolus* 444 се инхибират от ЕДТА, ЕГТА и трипсинов инхибитор (добавяни екзогенно към ферментационната среда). Трипсиновият инхибитор понижава активността на протеазите над 50%. И другите инхибитори имат по-силно или по-слабо изразен ефект. Това показва, че в екстрацелуларния протеолитичен комплекс синтезиран от *S. albobogriseolus* 444 участват различни по вид протеази - вероятно металопротеази и трипсинподобни.

Изследвана бе субстратната специфичност на секретираниите протеази само по отношение на БАПНА (специфичен субстрат на трипсин-подобните протеази) и отговорът към добавянето на трипсинов инхибитор в условия *in vitro*. Анализите са направени при култивирането на щама в хранителна среда с и без калциев йони. В присъствието на 30 mM Ca^{2+} протеолитичната активност на щама през експоненциалната фаза на растеж е по-ниска от тази в отсъствие на Ca^{2+} . Добавянето на трипсинов инхибитор към реакционната среда и в двата случая инхибира активността на протеазите, синтезирани от *S. albobogriseolus* 444 (фиг. 23).

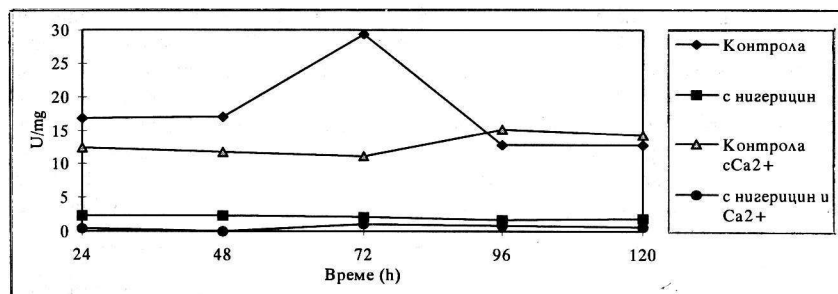


Фиг.23. Влияние на калциевите йони и трипсинов инхибитор върху протеолитичната активност на *S. albobogriseolus* 444, култивиран в среда Гаузе (контрола) и Минерална среда 1 по Гаузе с 30 mM CaCl_2 . Трипсиновият инхибитор е добавен в концентрация 1 µg/ml в реакционната среда при определяне протеазната активност при субстрат БАПНА.

За да бъде потърсена някаква връзка между синтезата на протеази, наличието на Ca^{2+} и вторичния метаболизъм на щама (синтезата на антибиотик) ние добавяхме екзогенно в средата един от компонентите на антибиотичния комплекс, синтезиран от щама. От фиг. 24 се вижда, че в присъствие на калциев йони и екзогенно добавен нигерицин (10 µg/ml), преди началото на култивиране, протеолитичната активност е значително по-ниска от тази в отсъствие на антибиотик. В литературата има данни показващи правопрпорционална

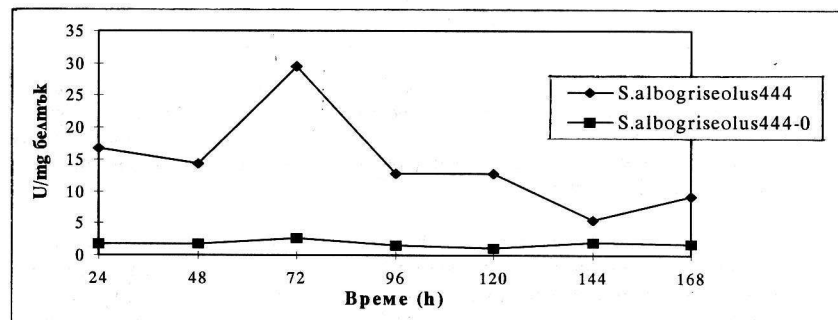
зависимост между антибиотичната активност и екстрацелуларната протеолитична активност, като се допуска връзка между вторичния метаболизъм и протеолитичната активност (Ginther, 1979). Ролята на протеазите според авторите, се заключава в осигуряването на аминокиселини за синтеза на антибиотика цефамицин от *Streptomyces lactamdurans*. Известно е също така, че някои аминокиселини са предшественици на един от антибиотиците (добавян от нас екзогенно към средата), синтезиран в най-голямо количество от *S. albogriseolus* 444.

Когато в средата не се съдържат Ca^{2+} , но има екзогенно добавен антибиотик, също се наблюдава потискане на протеазната активност, но по-слабо в сравнение с това в присъствие на Ca^{2+} .



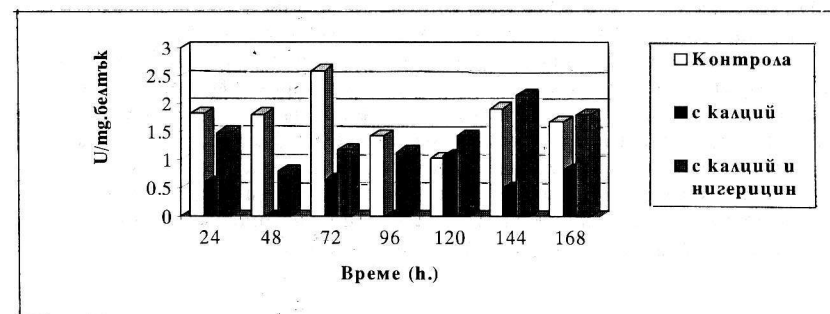
Фиг.24. Ефект на екзогенно добавен нигерицин върху активността на екстрацелуларните протеази, продуцирани при дълбочинно култивиране на *S. albogriseolus* 444 в Минерална среда 1 по Гаузе отсъствие и в присъствие на калциеви йони (5mM CaCl_2).

За потвърждаване на връзката между синтезирането на екстрацелуларни протеази и антибиотикообразуването бе определена протеолитичната активност на непродуктивния вариант.



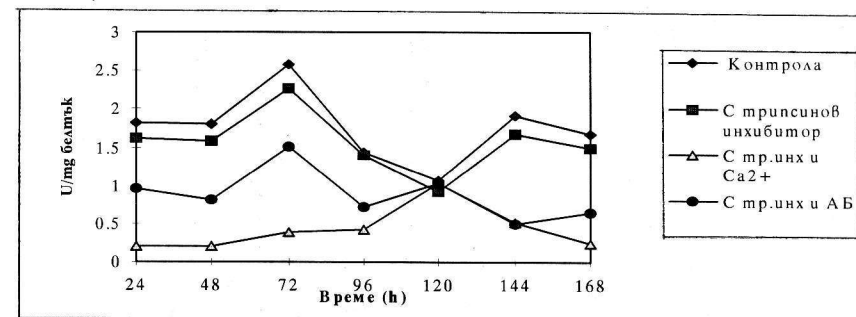
Фиг.25. Сравнение на протеолитичната активност на *S. albogriseolus* 444 и *S. albogriseolus* 444-0 култивирани в Минерална среда 1 по Гаузе в отсъствие на калций.

От фиг. 25 се вижда, че *S. albogriseolus* 444-0 показва значително по-ниско ниво на екстрацелуларната протеазна активност. Ефекта на Ca^{2+} е същия, както и при продуктивния вариант. По-слабо е влиянието на екзогенно добавения антибиотик. (фиг.26)



Фиг.26. Влияние на калциевите йони и нигерицин върху екстрацелуларната протеолитична активност на *S. albogriseolus* 444-0. Антибиотикът е добавен към средата за култивиране в концентрация $10\mu\text{g/ml}$.

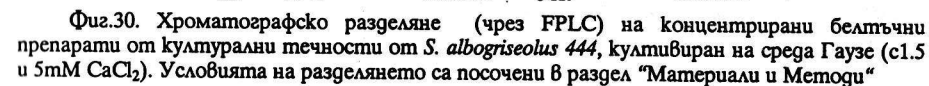
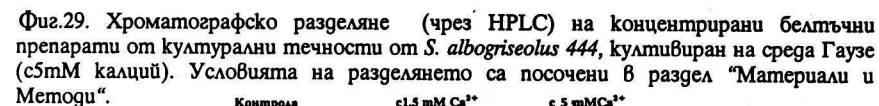
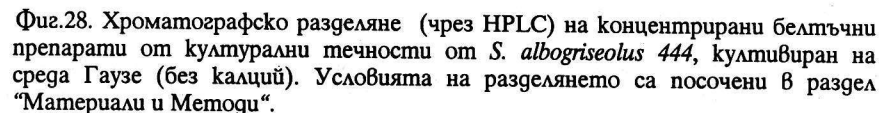
Наблюдаван бе и по-слаб ефект на трипсиновия инхибитор върху активността на синтезираните от *S. albogriseolus* 444-0, протеази. Подобно на активния вариант, инхибиторния ефект е по-ясно изразен след дълбочинно култивиране на щам в присъствие на калциеви йони и (или) антибиотик.



Фиг.27. Ефект на трипсинов инхибитор върху протеазна активност при *S. albogriseolus* 444-0 в процеса на дълбочинно култивиране в Минерална среда 1 по Гаузе. Трипсиновият инхибитор е добавен в концентрация $1\mu\text{g/ml}$ в реакционната среда при определяне протеазната активност при субстрат БАПНА.

От представените до тук резултати се вижда, че ефектът на калциевите йони върху активността на протеазите се изменя в зависимост от растежната фаза на културата, в съчетание с факторите на средата.

С цел охарактеризиране на екстрацелуларния протеазен комплекс, продуциран от *S. albobrissolus* 444 филтратите от културални течности, получени след култивиране на щама в среда без калций и със съдържание на калций от 1,5 и 5 mM бяха концентрирани с PEG (полиетиленгликол). Получените белтъчни препарати бяха използвани за хроматографско разделяне чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), за аналитично охарактеризиране. Получените резултати са представени на фиг.28 и 29. От фигурите се вижда, че добавянето на калциеви йони към културалната среда предизвиква изменения в елуационния профил. Може да се отбележи, че този ефект е най-силно изразен на 96-ия и 168-я час. Следователно може да се предположи, че калциевите йони предизвикват изменения в компонентния състав на екстрацелуларния протеолитичен комплекс, особено добре изразено при пиковите, елуиращи се между 11 и 16 мин.



В следващия етап от процеса на хроматографско изследване бе използвана йонообменна колона Моно Q (фиг.30). Събраните белтъчни фракции след елуиране бяха изследвани за протеолитична активност (със субстрат - казеин). В отсъствие на калций активността е локализирана в пикове 3 и 6, а в присъствие на калций аналогичните пикове не показват такава. Предварителните резултати ни дават основание да направим заключението, че йонообменната хроматография е подходящ метод за разделяне и очистване на протеазния комплекс, синтезиран от *S. albobogiseolus* 444.

С концентрираните проби от филтрати на културални течности с най-висока протеолитична активност при субстрат БАПНА бяха проведени предварителни кинетични изследвания. Бе определена константата на Михаелис-Ментен за сродство към субстрата. Нейната размерност е $1,02 \cdot 10^{-4}$ М. Установеното високо сродство към субстрата ни позволява да заключим, че в екстрацелуларния протеолитичен комплекс, синтезиран от *S. albobogiseolus* 444 се съдържат трипсин-подобни протеази. Тяхната активност се повлиява от наличието на калциеви йони в средата.

Наблюдаваното от нас многообразно действие на калциевите йони по отношение на различни ензими и морфологията на *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант доказват вероятната му роля като ефектор на физиологичния отговор при стрептомицети.

Разбирането на регулацията на метаболизма, в частност калциевата регулация и вторичния метаболизъм изисква комплексен подход. Така могат да бъдат диференцирани физиологичните сигнали и да се разкрият регулаторните механизми, които са отговорни за растежно-зависимата антибиотична синтеза при стрептомицетите.

Сравнителното изучаване на двата варианта на щама- продуцент показва, че различните физиологични параметри, които изследвахме вероятно действуват на различни нива в регулаторните каскади, формиращи една сложна регулаторна мрежа, ефектираща началото на антибиотичната продукция. Тази система е в съответствие с нуждите на стрептомицетния щам да узнае, интегрира и отговори на множеството сигнали, които постъпват както от средата, така от самата клетка. Това обяснява, в известна степен, наблюдаваните от нас различия в активностите на изследваните ензими от първичния метаболизъм при *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант. както и различния ефект на компонентите на средата и калциевите йони.

Изводи

В резултат на проведените изследвания могат да бъдат направени следните изводи:

1. Антибиотичната биосинтеза при *S. albobogiseolus* 444 се осъществява при достигане определено съотношение в активността на ензимите, осъществяващи усвояването на глюкозата (в качеството на единствен въглероден източник в средата).

2. Високите нива на активност при Г6ФДХ, пируват киназата и нивото на АТФ в клетката, корелират с началото на антибиотичната продукция и енергообезпечаване.

3. Разработен е достъпен метод за изолиране и пречистване на ензима НАД киназа от *S. albobogiseolus* 444. За първи път е изолиран и частично охарактеризиран този ензим от стрептомицетен щам. Определена е молекулната му маса- 141 219 Да.

4. Най-висока НАД киназна активност е отчетена в началния етап на антибиотична продукция и при достигане на нейния максимум. Екзогенно добавеният нигерицин стимулира НАД киназната активност, паралелно с потискане усвояването на фосфати от средата и с понижаване натрупването на биомаса и при двата варианта на щама.

5. За първи път са изолирани и частично характеризирани 2 типа мембранносвързани АТФази-калций и магнезий зависима, от стрептомицетен щам, продуцент на полиетерен антибиотик. Доказано е участието им в енергозависимите процеси при *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

6. Успешно е солубилизиран комплекс F_1 , чувствителен към азид, което доказва наличието на АТФаза от F тип при *S. albobogiseolus* 444.

7. Калциевите йони са важен ефектор на различни процеси при изследвания от нас стрептомицетен щам: -Калций стимулира процесите на споруляция на щама и неговия вариант в течни и агарови среди.

-Калциевите йони в концентрация 1.5 mM и 30 mM изменят динамиката на натрупване на биомаса при двата варианта на щама без да променят съществено нивото на антибиотична продукция.

-Усвояването на екзогенния Ca^{2+} е най -интензивно през първите 24 часа от култивирането на *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант. В присъствие на нигерицин изчерпването на Ca^{2+} е почти пълно.

-Калциевите йони понижават активността на синтезираните екстрацелуларни протеази при *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант.

8. *S. albobogiseolus* 444 синтезира екстрацелуларен протеолитичен комплекс, в състава на който участват трипсин-подобни протеази, характеризиращи се с високо сродство към субстрат БАПНА ($K_m - 1,02 \cdot 10^{-4}$).

9. Металопротеази и трипсин-подобни протеази, синтезирани от *S. albobogiseolus* 444 са отговорни за диференцирането на субстратния мицел във въздушен и за формирането на спори.

Справка за приносите в дисертационния труд

В представената за защита дисертация могат да бъдат посочени следните приноси:

1. Чрез сравнителното изследване активността на ензими, участващи в различни катаболитни пътища при *S. albobogiseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант е установено, че процесът на антибиотикообразуване се иницира при достигане на определено съотношение в активността на ензимите, осъществяващи усвояването на глюкозата. По този начин се допълват данните за взаимодействието му първичен и вторичен метаболизъм и механизмите на обща и специфична регулация, при стрептомицети, продуценти на полиетерни антибиотичи.

2. За първи път е изолирана и частично охарактеризирана НАД⁺ киназа от стрептомицетен щам, като е предложен гостъпен метод за изолиране и пречистване на ензима.

3. За първи път от стрептомицети-продуценти на антибиотици са изолирани два типа мембрано-свързани АТФ-ази - Ca^{2+} Mg^{2+} - зависими.

4. Доказана е ролята на Ca^{2+} , екстрацелуларните протеази и собствено - продуцирания антибиотик в процесите на регулация на диференциацията и антибиотикообразуването при *Streptomyces albogriseolus* 444.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Иванова И.В., Христова К.Р., Данова С.Т., Мончева, П.А., (1994), Влияние йонов калция на диференциацию актиномицетов. Антибиотики и химиотерапия, том 39, No 11, 21-29.

2. S. Danova, I. Ivanova, I. Minkov, G. Ivanov, (1995), Characterization of ATPsynthase from *Streptomyces albogriseolus* 444. Beijerinck Centennial microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging principles and Applications, The Hage, 1995, 10 - 14 dec., p.239 - 240.

3. S. Danova, I. Ivanova M. Naidenova, I. Minkov, (1996), Characterization and partial purification of ATPsynthase from *Streptomyces albogriseolus* 444 (in press) Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 1996, tome 49, No7, 1994.

4. И. В. Иванова, С. Т. Данова, А. Е. Пантев П. А. Мончева (1997). Изолирование и частично характеризирование НАД+киназы штамма *S.albogriseolus* 444 (in press).

5. П. Мончева, С.Т. Данова, С.К.Антонова, И.В. Иванова(1997) Физиологическая роль экстрацеллюлярных протеаз и ионов кальция в процессах диференциации и антибиотикообразования *Streptomyces albogriseolus* 444 (in press).

II. Научни съобщения на конгреси:

1.Ivanova I. & Danova S.,(1990), NAD kinase activity in antibiotic produsing *Streptomyces* strains. 20th FEBS Meeting, Budapest, N441, p. 320.

2. Danova S. & Ivanova I., (1990), NAD kinase activity in antibiotic produsing *Streptomyces* strains. Fourth Internationa school of young microbiologists - Varna, N 2, p. 13.

3.Danova S., Tz. Penev and Ivanova I., (1991), NAD kinase activity from *Streptomyces albogriseolus*. 15th International Congres of Biochemistry, (1991), Jerusalem, Izrael, p.41

4. Danova S., Ivanova I., and I. Minkov, (1994), ATP - syntase (ATFase) of *Streptomyces albogriseolus* 444 and its antibiotic non-produsing variant. 10th BBBB - Varna, I-16, p.372.

5. Moncheva P., Danova S.,Christova K., and I. Ivanova, (1994), Efect of calcium jons on sporulation in actinomyces. 9th Internationa Symposium on Biologi of Actinomyces, Moskow, Russia.

6. Danova S., & Ivanova I., (1996), Effect of calcium ions during sporulation *Streptomyces albogriseolus* 444. XIII Nat. Biochem. Congr., 26 - 30 March, 1996, Antalya, Turkey.