

З.В.Маршавина, В.А.Газарян

О ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИЗИНА

Роль дегидрогеназ, как ферментов из класса оксидоредуктаз, заключается в том, что они катализируют первый этап процесса дыхания, отнимая водород от окисляемого субстрата (Hooper, 1967).

В то же время некоторые дегидрогеназы катализируют процесс окислительного аминирования, принимая участие в синтезе аминокислот. Так например, благодаря глутаматдегидрогеназе у микроорганизмов и растений происходит усвоение аммиака путем аминирования α -кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой кислоты (Кретович, 1967). Важная роль дегидрогеназ в обмене веществ вызывает большой интерес ученых (Sheinin, 1958; Gros, 1958; Durell, 1960). Сравнительно хорошо изучены в этом плане дегидрогеназы DL-аланина и L-глутаминовой кислоты у различных представителей рода *Bacillus* (Hand, Shen, 1959) и *Mycobacterium* (Озолинь, 1964).

Так, сравнительное изучение дегидрогеназ у *Ast. erheroides* показало, что образующий новобиоцины штамм отличается от необразующего в 2,5-3 раза более высокой дегидрогеназной и каталазной активностью (Торопова, Егорова и др., 1970). В бесклеточных экстрактах из эффективных штаммов *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. trifolii* активность аланиндегидрогеназы во всех опытах была выше, чем в бесклеточных экстрактах из неэффективных штаммов бактерий. Активность сукцинатдегидрогеназы в экстрактах из эффективных штаммов также была выше, чем в экстрактах из неэффективных штаммов (Кретович, Евстигнеева и др., 1969).

За последние годы японские ученые обращали большое внимание на связь между активностью дегидрогеназ и биосинтетической активностью продуцентов аминокислот.

Сийо с сотрудниками (Shiio, Otsu, Takahashi et al, 1959, 1961), культивируя *Brevibacterium flavum* штамм 2247 на глюкозе и получая из клеток экстракты, обнаружил в них все ферменты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). В свою очередь Кимура (1964) для *M. glutamicus* шт. 560 установил, что активное окисление органических кислот ЦТК способствует высокому выходу аминокислот.

Изучая связь между интенсивностью синтеза лизина и активностью дегидрогеназ мутантов *Brevibacterium* штамм 22, Гривинь (1968) обнаружила, что мутанты и исходная культура, синтезирующие значительное количество лизина и аланина, имеют повышенную общую дегидрогеназную активность по сравнению с мутантом 32, слабо накапливающим лизин.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использовать дегидрогеназную активность штаммов как способ предварительного отбора активных по биосинтезу лизина продуцентов, а также выяснение характера изменений ферментативной активности в связи с лизинообразованием у продуктивных культур.

Объекты и методы

Объектами исследований явились мутанты *M. glutamicus* шт. 95, применяемый для промышленного синтеза лизина и *M. glutamicus* шт. 28.

Для определения дегидрогеназной активности был взят небелковый акцептор водорода 2,3,5 - трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который при восстановлении образует формазан: густота окраски последнего определялась колориметрически. В качестве субстратов использовали 0,1 М растворы натриевых солей, - кетоглутаровой, янтарной и лимонной кислот, pH 7-7,2. Опыт проводили с живыми интактными клетками, выросшими на среде, содержащей глюкозу, фосфат аммония, минеральные соли, необходимые аминокислоты (метионин, треонин) и биотин.

Дегидрогеназную активность определяли ежедневно по ходу ферментации. Микробные клетки центрифугировали, дважды отмывали 1/15М фосфатным буфером, pH 7,2 и суспендировали в том же буфере. Суспензию вносили в химический стаканчик в количестве 1 мл/100 мг пасты, туда же добавляли 1 мл 1%-ного раствора ТТХ и 1 мл субстрата.

Продолжительность экспозиции 30 минут, при 30° (водяная баня). За это время появляется красный осадок формазана, который элиминировали этиловым спиртом, колориметрировали на ФЭК-М-54 с зелёным светофильтром (№ 6). Активность дегидрогеназ выражали в мкг восстановленной соли ТТХ на 100 мг сухого веса бактерий. Количество формазана вычисляли по калибровочной кривой, построенной для формазана.

Контролем служили смеси без субстратов.

Результаты и обсуждение

Опыты, проведенные на продуцентах лизина с различным уровнем биосинтеза с целью определения их активности окисления различных органических субстратов (натриевые соли α -кетоглутаровой, лимонной и янтарной кислот) показали на присутствие соответствующих дегидрогеназ (α -кетоглутарат-, цитрат- и сукцинат-дегидрогеназы).

Сравнительные данные дегидрогеназной активности штаммов *M. glutamicus*, являющихся активными и малоактивными по биосинтезу лизина, представлены в таблице I.

Штаммы 4, 9, 10, накапливающие лизин в среде в пределах от 5-10 г/л были получены из культуры *M. glutamicus* шт. 95 в результате многократного отбора вариантов с пониженной активностью. Ссылаясь на представленные в таблице данные можно сделать заключение о том, что между опосредованностью к лизинообразованию и дегидрогеназной активностью штаммов существует определенная зависимость. Слабоактивные по биосинтезу лизина штаммы характеризуются низким уровнем дегидрогеназной активности. Опыты показали, что дегидрогеназная активность штаммов, слабо синтезирующих лизин в 3-4 раза меньше таковой активных продуцентов. Используя данные той же таблицы I следует указать, что нам не удалось отметить какой-либо ферментативной активности у слабых продуцентов лизина к 28 часу ферментации, в то время как штамм 95 к этому сроку активно окислял использованные нами субстраты.

При изучении характера изменения дегидрогеназной активности продуцентов лизина *M. glutamicus* шт. 95 в 28 в процессе ферментации было установлено (см. таблицу 2), что максимальная ферментативная активность приходится у этих штаммов на 48-52 час фермен-

тации. Именно на эти часы падает и наиболее активный процесс биосинтеза лизина и культур. Наглядно это продемонстрировано на рисунках 1, 2. Незначительное увеличение количества лизина в среде к 72 часу ферментации, которое видно на рисунке — это скорее результат разрушения клеток и испарения культуральной жидкости. К концу ферментации (к 72 часу) активность Δ -кетоглутарат-, цитрат- и сукцинатдегидрогеназ заметно снижается и, если продолжить ферментацию до 108 часов, становится совсем незначительной. Оба продуцента *M. glutamicus* шт. 95 и 28 на протяжении всего процесса ферментации наиболее активно окисляли субстрат цитрат натрия, что говорит о наличии среди изучаемых ферментов более активных цитратдегидрогеназ. То, что снижение дегидрогеназной активности к концу ферментации не связано с большим накоплением лизина в среде, как это наблюдалось у продуцента новобактерина *Actinomyces sphaeroides* (Торопова, Егоров и др., 1970), показали опыты с добавками лизина в среду.

Таблица I

Дегидрогеназная активность мутантов *M. glutamicus*
(МИГ формазан/100 мг абс. сух. биомассы)

Штаммы M. glu- tamicus	Субстрат, натриевые соли кислот	Дегидрогеназная активность			Лизин к 72 часу, г/л
		возраст культуры, ч а с			
		28	52	72	
4	Δ-кетоглутаровая лимонная янтарная	сл.	700	450	9
		сл.	700	575	
		сл.	950	625	
9	Δ-кетоглутаровая лимонная янтарная	сл.	125	-	5
		сл.	200	-	
		сл.	575	125	
10	Δ-кетоглутаровая лимонная янтарная	сл.	625	250	6
		сл.	750	300	
		сл.	575	-	
95	Δ-кетоглутаровая лимонная янтарная	1175	2300	1175	19
		1500	2450	1700	
		1325	2500	1125	

В таблице 3 представлены результаты наблюдений за изменением дегидрогеназной активности, у штаммов *M. glutamicus* 95 и 28, развивавшихся на среде, содержащей 10 мг/мл лизина перед началом ферментации и до 30 мг/мл — в конце.

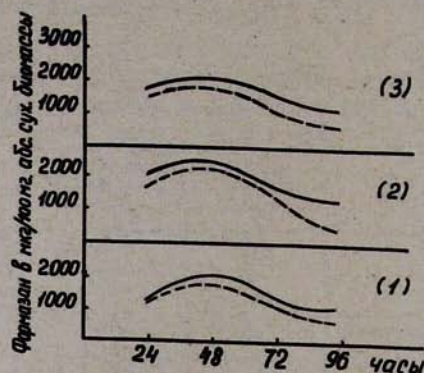
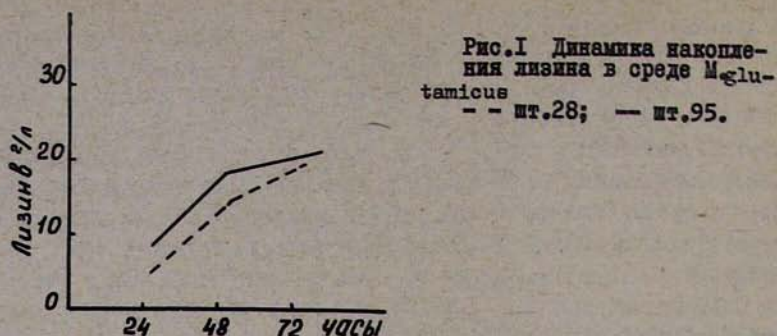


Рис.2 Дегидрогеназная активность в процессе ферментации *M. glutamicus* --- шт.28; — шт.95
 1 - глутаматдегидрогеназа, 2 - цитратдегидрогеназа, 3 - сукцинатдегидрогеназа.

Таблица 2

Активность дегидрогеназ *M. glutamicus* шт. 95, 28 в процессе ферментации (мкг формазан / 100 мг абс. сухой биомассы).

Штаммы <i>M. glu- tamicus</i>	Субстрат, натриевые соли кис- лот	Дегидрогеназная активность							
		возраст культуры, ч а с							
		24	28	48	52	72	76	96	108
95	α-кето- глутаровая	1375	1875	2125	3075	1325	1175	1125	625
	лимонная	2125	2125	2650	3675	1875	1700	1585	1125
	янтарная	1875	2125	2285	2375	1700	1625	1125	250
28	α-кето- глутаровая	1325	1750	1875	2825	1250	275	750	600
	лимонная	1875	2450	2500	2500	1750	1300	500	625
	янтарная	1750	1875	2000	2375	1350	1300	750	следы

Таблица 3

Дегидрогеназная активность *M. glutamicus* шт. 95, 28 при добавлении лизина в среду (мкг формазана / 100 мкг абс. сух. биомассы)

Субстрат, натриевые соли кис- лот	Штаммы <i>M. glu- tamicus</i>	Дегидрогеназная активность	
		контроль	добавка к среде 10 мг/мл лизина
α-кето- глутаровой	95	1325	1125
	28	1250	1250
Лимонной	95	1875	1750
	28	1750	1625
Янтарной	95	1700	2125
	28	1350	1875

Как видно из представленных данных, α-кетоглутарат и цитратдегидрогеназная активность в обоих случаях оставались на одном и том же уровне, а сукцинатдегидрогеназная активность даже несколько возрастала с добавками лизина в среду. По-видимому в отличие от актиномицета — продуцента новобеоцина, у которого ингибируется дегидрогеназная активность при добавлении антибиоти-

на в среду, понижение подобной активности у продуцентов лизина в конце ферментации не связано с накоплением лизина в среде, а является специфич. культур.

Проведенные эксперименты и полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы:

1. Активность дегидрогеназ у штаммов, синтезирующих лизин находится в прямой зависимости от их биосинтетических особенностей.

2. Максимум активности α -кетоглутарат-цитрат- и сукцинатдегидрогеназ по времени в процессе ферментации совпадает с максимумом биосинтеза лизина у изученных культур.

3. Характер изменения дегидрогеназной активности в процессе ферментации не зависит от количества лизина в среде, а является специфическим свойством продуцентов.

4. Определение дегидрогеназной активности штаммов может быть методом предварительного отбора активных продуцентов лизина.

Զ.Վ.Մարշավինա, Վ.Ա.Դազարյան

ԼԻԶԻՆ ԱՐՏԱԴՐՈՂ ԿՈՒՆՏՐՈՒՄԵՆՏԻ ԴԵԶԻՆՈԳԵ-
ՄԱՋՍՅՈՒՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Ուսումնասիրվել է α -կետոգլուտարատ-ցիտրատ-և սուկցինատ-դեհիդրոգենազային ակտիվության դինամիկան ֆերմենտացիայի պրոցեսում և լիզին արտադրող կուլտուրայի մաս: Աշխատանքի նպատակն է բացահայտել բիոսինթետիկ և դեհիդրոգենազային ակտիվության կապը. բարձր էֆեկտիվությամբ և լիզին արտադրող կուլտուրայի ընտրության համար:

Ապացուցվում է, որ լիզին սինթեզող կուլտուրաների բիոսինթետիկ հասկությունները և դեհիդրոգենազային ակտիվությունը զանվում են ուղղակի կախվածության մեջ:

Դեհիդրոգենազային ակտիվության որոշումը կարող է ծառայել որպես լիզին արտադրող ակտիվ կուլտուրայի նախնական ընտրման մեթոդ:

Z.V.Marshavina, V.A.Gasarian

ABOUT THE DEHYDROGENASE ACTIVITY
OF LYSINE PRODUCERS.

S U M M A R Y

The character of the change of α -ketoglytarat-, citrat-, succinatdehydrogenase activity of the lysine producers during of the fermentation have been studied.

It was established the direct dependence between of dehydrogenase activity and the lysine biosynthesis.