

А. А. ХАЧАТУРЯН, Р. А. САВЧЕНКО

ОБРАЗОВАНИЕ АЦИЛАЗ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Получение микробных ацилаз для асимметрического гидролиза ацилпроизводных аминокислот и других ценных соединений имеет большое практическое значение [1, 10].

Ацилазы, подобно другим ферментам, обладают специфичностью действия как в отношении радикала производного аминокислот (например, ацетил-, бензоил-, сукцинил-, капроил- и др.), так и в отношении самой аминокислоты (например, ацетилметионин, ацетилтреонин, бензоилтреонин и др.).

Специфичность ацилаз проявляется также различно в связи с оптической конфигурацией и альфа, ипсилон и другими положениями радикала производных аминокислот.

Из ацилазных ферментов впервые была открыта и изучена аспартоацилаза (из тканей почек свиней) Гринштейном, Бирнбаумом и другими [7, 10, 12]; ацетилорнитиндеацетилаза была обнаружена в культурах *Escherichia coli* Фогелем и Боннером [14, 15]; Гринштейн и Винитц выделяли из почек животных ацил-лизиндеацетилазу, Киндлер и Гилварг [11]—сукцинилдиаминопимелатдесукцинилазу из бактерий.

Приведенные данные суммированы в работе Диксона и Уэбба [2].

За последнее десятилетие большой сдвиг в области получения ацилаз произошел благодаря работам японских исследователей. Это работы Чибата и других [8, 9], развиваемые в направлении получения грибных ацилаз из культур видов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* и др. Ими было установлено также наличие ацилазной активности у плодов овощных и фруктовых растений, а также у прорастающих семян бобовых и злаков.

Рубан и Харцхаева в 1968 году изучали оптимальные условия образования оптически направленной L-триптофандаеацетилазы у некоторых штаммов *Mycobacterium* и *Pseudomonas*, а также активность полученных из них трех видов ферментных препаратов — сырой биомассы, экстрактов из них и ацетоновых порошков [4].

Ацилазы бактерий изучались Кимурой и Африкьяном [6], которые установили, что источником для подбора продуцентов ацилаз может быть группа спороносных бактерий, и выделили ряд штаммов, обладающих широким (у некоторых штаммов *Bac. coagulans*, *Bac. brevis*, *Bac.*

roseus и др.) или узким (у некоторых штаммов *Vac. subtilis*, *Vac. mycoides*) спектром ацилазной активности.

Первые исследования по подбору продуцентов ацилаз, гидролизующих бензоил-лизин, принадлежат Чибата и его сотрудникам [8, 9]. Из испытанных 110 культур микроорганизмов лишь небольшое число дрожжей, относящихся к *Rhodotorula glutinis*, обладали указанной активностью, штаммы актиномицетов проявляли очень слабую деацилирующую способность, а изученные штаммы бактерий, принадлежащие к *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aerobacter*, вовсе не гидролизовали бензоил-лизин.

В Институте микробиологии АН АрмССР под руководством Э. К. Африкяна в течение последних лет исследуется ацилазная активность разных групп микроорганизмов, в том числе большой коллекции углеводородокисляющих бактерий, выделенных нами из разных почв Армении [5].

Материал и методы исследований. В нашу задачу входило, с одной стороны, установление спектра действия ацилаз у углеводородокисляющих микроорганизмов, с другой,—изучение их синтеза при окислении различных углеводов как единственных источников углерода.

Деацилирующая способность углеводородсваивающих штаммов изучалась по следующей методике. Из односуточных культур, выросших на пептонном агаре при 37°, и 3—4-суточных культур, выросших в синтетической среде с углеводородами, на качалке, при 30°, готовилась суспензия в 0,2% водном растворе ацилпроизводного аминокислоты с pH 7,2. В каждую пробирку, содержащую 2 мл раствора, добавлялось по 2 капли толуола для разрушения клеток и выделения внутриклеточного фермента.

Пробирки выдерживались в течение суток при 37°, после чего определенное количество опытного раствора наносилось на хроматографическую бумагу. Деацилирование испытуемого субстрата определялось по наличию нингидринположительного пятна соответствующей аминокислоты, а в отношении бензоил-лизиназы—по появлению пятна изина при разгонке хроматограммы в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5) и проявлению в 0,2% растворе нингидрина в бутаноле.

Обсуждение результатов. Ацилазная активность в отношении ацетил-метионина была изучена у 117 штаммов углеводородсваивающих микроорганизмов.

На рис. 1 приведены результаты этого исследования, суммированные по таксономическим группам микроорганизмов. Штаммы в каждой группе подразделены на имеющие сильную, среднюю, слабую активность и лишенные ее. Из рисунка явствует, что все 3 штамма (593, 676, 677), обладающие сильной ацилазной активностью, относятся к микобактериям. Средней активностью характеризуется 23 штамма, относящиеся к микобактериям и бактериям, 1 штамм—к *Pseudomonas* и 1 штамм—к актиномицетам.

Остальные штаммы слабо активны, либо вовсе не активны. Способность деацилировать ипсилон-бензоил-лизин изучена у 132 культур углеводородокисляющих микроорганизмов (рис. 2). Из них отобрано 16 наиболее активных культур как перспективные для внедрения в микробиологическую промышленность.

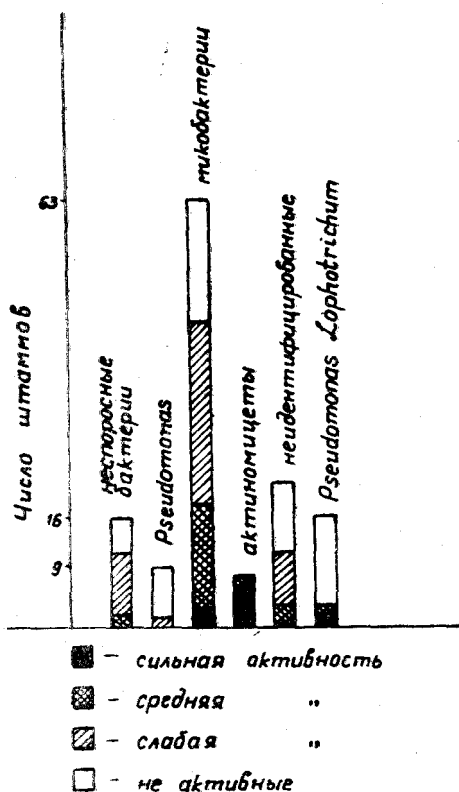
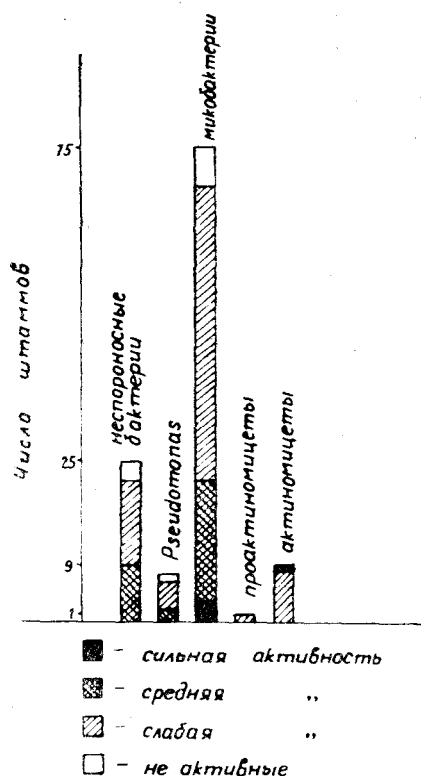


Рис. 1. Ацетилметиониназная активность углеводородокисляющих микроорганизмов по группам.

Рис. 2. Бензоил-лизиназная активность углеводородокисляющих микроорганизмов по группам.

Все указанные штаммы определены до вида на основании комплекса культуральных, морфологических, биохимических и физиологических свойств, за исключением двух культур, определенных до рода. Как видно из табл. 1, изученные микроорганизмы относятся к *Mycobacterium salivarium*, *Myc. perrigosum ethanicum*, *Myc. lacticolum*, *Myc. coeliacum*, *Bacterium aliphaticum*, *Pseudobacterium rosea-album*, *Myc. species* и *Actinomyces species*.

Образование ацилаз этими штаммами, для сравнения, изучалось в 4-х вариантах опыта, где микроорганизмы выращивались на рыбном питательном агаре (РА), на синтетической среде (ОС) следующего состава (в г): K_2HPO_4 —7,0, KH_2PO_4 —3,0, $MgSO_4$ —0,1, $(NH_4)_2SO_4$ —1,0 $NaCl$ —0,5, водопроводная вода—до 1 л, причем в качестве источника углерода использовался гексадекан (УВ) с концентрацией в среде—1%, а также на той же синтетической среде, но с парафином (смесь н-алканов от C_{10} до C_{23}) в качестве единственного источника углерода.

В четвертом варианте к синтетической среде с гексадеканом добавлялся 0,1% раствор бензоил-лизина для индукции соответствующей ацилазы и 1 капля твина-80 для гомогенизации культуры в ферментационной среде.

Бензоял-лизиновая активность углеводородокисляющих микроорганизмов при развитии их на разных средах

Видовая принадлежность	№ культуры	Образование ацилаз при развитии на РА(рыбном агаре)	Образование ацилаз на ОС+УВ		Образование ацилаз на ОС+парафин		Образование ацилаз на ОС+УВ+бензоил лизин 0,1 ₀ /о+1 капля твина-80	
			рост	ацилазная активность	Рост	ацилазная активность	рост	ацилазная активность
<i>Mycobacterium coeliacum</i>	615	+++*	+++ , большой комок	+	хлопья	+++	++ , молочная муть	+++
<i>Mycobacterium coeliacum</i>	625	+++	+++ , зерна и комки	—	+++ , хлопья	+++	+++ , молочная муть	—
<i>Mycobacterium perrugosum ethanicum</i>	628	++	+++ , крупинки	—	+++ , хлопья	—	+++ , молочная муть	+
<i>Mycobacterium perrugosum ethanicum</i>	629	++	— , слабая пленка и комки	+++	комки	—	++ , молочная муть, мелкие хлопья	—
<i>Bacterium aliphaticum</i>	632	+++	+++ , слабая пленка	+++	+++ , хлопья	—	++ , молочная муть, крупинки	+
<i>Mycobacterium coeliacum</i>	637	++	++ , крупинки и комки	+++	++ , комки, хлопья	+	++ , молочная муть, зерна	+
<i>Mycobacterium salivarium</i>	638	+++	++ , крупинки	—	+, хлопья	—	+++ , желтоватая муть	+++
<i>Mycobacterium salivarium</i>	641	+++	+, большой комок	—	много белых нитей	—	++ , молочная муть, желтоватый комок	+
<i>Mycobacterium species</i>	647	++	+, обрывки пленки	—	+++ , хлопья, комки	—	++ , молочная муть	+
<i>Pseudobacterium rosealbum</i>	652	++	+, крупинки в большом количестве	—	+, хлопья, комки	—	++ , молочная муть, желтоватые комки	+
<i>Actinomyces species</i>	673	++	±, желтоватый комок	+	—	—	—, желтоватые комки	—
<i>Mycobacterium lacticolium</i>	674	+++	+++ , комки	+	+++ , нити, комки	+++	+, желтоватая муть, желтоватые комки	—
<i>Mycobacterium salivarium</i>	681	++	+++ , зерна	—	+++ , хлопья	—	++ , желтоватая муть, желтоватые комочки	+
<i>Mycobacterium salivarium</i>	682	++	+++ , крупинки	—	—	—	++ , муть и комки	—
<i>Bacterium aliphaticum</i>	685	++	+++ , хлопья	—	—	—	очень мало хлопьев	—
<i>Mycobacterium salivarium</i>	687	++	+++ , зерна	+	+++ , 3 больших комочка	—	+, молочная муть	—

* Плюсами обозначена разная интенсивность роста и ацилазной активности изученных штаммов, минусами—отсутствие роста и ацилазной активности.

Из представленных в табл. 1 результатов видно, что ацилазная активность у штаммов наиболее четко проявляется на богатой органической среде — рыбном питательном агаре. Однако она заметна и на среде, где единственным источником углерода является гексадекан, и несколько слабее — в варианте с парафином.

На синтетической среде со смесью углеводов наилучшее образование ацилаз дают штаммы 629, 632 и 637. По-видимому, эта среда, как доступная и дешевая, может быть использована для синтеза ацилаз в более широком масштабе.

В IV варианте добавление 0,1% бензоил-лизина выявило ацилазную активность у большего числа штаммов (10 вместо 8). Введение твина-80 не предотвратило агглютинации клеток, характерной для роста микроорганизмов на углеводородах [3].

При изучении спектра действия ацилаз тех же 16 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов использовалась вышеописанная методика с применением 13 субстратов — производных аминокислот с разными радикалами при выращивании их на минеральной среде с добавлением смеси углеводов (табл. 2) или парафина (табл. 3) в каче-

Таблица 2

Спектр ацилазной активности культур при использовании ими гексадекана в качестве единственного источника углерода

№ № культур	Н-ацетил дегидро-DL-аланин	Ацетил-DL-лейцин	Ацетил-DL-норлейцин	Ацетил-DL-фенил-аланин	Ацетил-DL-валин	ацетил-DL-триптофан	Ацетил-DL-метионин	Бензоил-L-аспарагин	Бензоил-L-гистидин	Бензоил-DL-метионин	Бензоил-аминокапроновая кислота	Бензоил-DL-лейцин	Бензоил-аминовалин
615	++	—	++	—	+	—	++	+	+	—	+	++	+
625	++	—	++	—	+	—	++	—	—	—	—	—	—
628	—	++	++	+	++	—	++	—	—	—	—	++	+
629	—	++	++	+	++	—	++	—	+	+	+	++	+
632	—	+	+	—	++	—	++	—	—	—	—	—	—
637	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38	+	++++	++++	—	+	—	+	—	—	—	—	++	+
641	—	+	++	—	—	—	+	+	+	+	+	++	+
647	—	+	++	+	++	—	+	—	—	—	—	++	—
652	—	++	+++	+	++	+	+	—	—	+	+	++	—
673	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
674	—	+	+	++	++	—	—	—	—	—	—	+	—
681	—	—	—	—	—	—	++	—	—	++	—	++	—
682	—	++	+++	++	+++	—	++	—	—	—	—	++	—
687	—	++	++	—	++++	—	+	—	—	—	—	—	—

* Условные обозначения:

++++ — очень сильная ацилазная активность;

+++ — сильная ацилазная активность;

++ — средняя ацилазная активность;

— слабая ацилазная активность;

— — отсутствие ацилазной активности.

Таблица 3

Спектр ацилазной активности культур при использовании ими парафина
в качестве единственного источника углерода

№№ культур	N-ацетил дегидро-DL-аланин	Ацетил-DL-лейцин	Ацетил-DL-норлейцин	Ацетил-DL-фенилаланин	Ацетил-DL-валин	Ацетил-DL-триптофан	Ацетил-DL-метионин	Бензоил-L-аспарагин	Бензоил-L-гистидин	Бензоил-DL-метионин	Бензоил-аминокапроновая кислота	Бензоил-DL-лейцин	Бензоил-аминовалин
615	— *	+++	+++	+	+++	—	+++	—	—	+++	—	++	—
625	—	++	+++	++	+++	—	+++	—	—	++	—	—	—
628	—	++	+++	—	+++	—	+++	—	—	—	—	—	—
629	—	++	+++	—	+++	—	+++	—	—	—	—	—	—
632	—	+++	+++	—	+++	—	+++	—	+	—	—	—	—
637	—	++	+++	—	++	+	+++	—	—	—	—	—	—
638	—	+++	+++	+	+++	—	+++	—	—	—	—	++	—
641	—	—	+++	—	+++	—	+++	—	—	—	—	—	—
647	—	+	+++	—	++	—	++	—	—	+	—	+	—
652	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
673	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
674	—	—	+++	—	++	—	++	—	—	—	—	—	—
681	—	—	+++	++	+++	—	++	—	—	++	—	++	+
682	—	+	+++	—	+++	—	++	—	—	—	—	—	—
685	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
687	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Условные обозначения:

+++ — сильная ацилазная активность,

++ — средняя ацилазная активность,

— слабая ацилазная активность,

— — отсутствие ацилазной активности.

стве единственного источника углерода. Из таблиц видно, что в обоих случаях получились сходные результаты. Многие из микроорганизмов проявляют ацилазную активность по отношению к следующим субстратам: ацетил-DL-лейцину, ацетил-DL-норлейцину, ацетил-DL-валину, ацетил-DL-метионину и бензоил-DL-лейцину. Слабая активность наблюдается в отношении N-ацетилдегидро-DL-аланина, ацетил-DL-фенилаланина, бензоиламиновалина, ипсилонбензоиламинокапроновой кислоты и почти никакой активности — к ацетил-DL-триптофану, N-бензоил-L-аспарагину и N-бензоил-L-гистидину.

Более детальное изучение выявляет некоторую разницу в ацилазной активности в отношении отдельных субстратов при использовании гексадекана или парафина в качестве источника углерода. Например, штамм 687 на гексадекане активно деацилирует ацетил-DL-валин и во все не обладает активностью в отношении этого же субстрата при усвоении парафина. Штамм 641 активно деацилирует бензоил-DL-лейцин при росте на гексадекане и не обладает активностью в отношении к тому же субстрату при окислении парафина. Такая же закономерность наблюдается в отношении бензоиламиновалина и бензоиламинокапроновой кислоты.

Таким образом, при развитии на минеральной среде с гексадеканом в качестве источника углерода изученные микроорганизмы проявляют в целом несколько более высокую ацилазную активность, чем при усвоении парафинов.

Проведенные исследования позволяют заключить, что из отобранных по ацилазной активности 16 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов большая часть относится к микобактериям (*Mycobacterium salivarium*, *Myc. coeliacum*, *Myc. lacticum*, *Myc. perrugosum ethanicum*, *Myc. species*), часть — к бактериям (*Bacterium aliphaticum*, *Pseudobacterium rosea-album*) и 1 штамм — к *Actinomyces*; изученные штаммы различаются по степени активности ацилаз в отношении к субстрату.

Испытанная нами синтетическая среда с гексадеканом в качестве единственного источника углерода может быть предложена для выращивания продуцентов ацилаз.

Институт микробиологии
АН АрмССР

Поступило 12.I 1970 г.

ԱՅԻԼԱԶՆԵՐԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒՄԸ ԱԾԽԱԶՐԱԾԻՆՆԵՐ ՅՈՒՐԱՑՆՈՂ

Ա. Ա. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍԱՎՉԵՆԿՈ

ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՅ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ածխաջրածինների յուրացնող 132 շտամների ի պսիլոն-բենզոլիլ-լիզինազային ակտիվությունը: Նրանցից ընտրվել են 16 առավել ակտիվ կոլտուրաներ, որոնք պատկանում են միկրոբակտերիաներին և բակտերիաներին, որպես հեռանկարային կոլտուրաներ միկրոբիոլոգիական արդյունաբերության մեջ ներդնելու համար:

Ացիլազների պրոդուցենտների փորձարկումները կատարվել են սինթետիկ սննդանյութի վրա, որտեղ որպես ածխածնի աղբյուր ծառայել է ածխաջրածինների խառնուրդը կամ պարաֆինը:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ուսումնասիրված միկրոօրգանիզմների մեծ մասը ցուցաբերում են ամենաբարձր ազիլազային ակտիվություն՝ ացետիլ-DL-լեյցինի, ացետիլ-DL-նորլեյցինի, ացետիլ-DL-վալինի, ացետիլ-DL-մեթիոնինի և բենզոլիլ-DL-լեյցինի նկատմամբ:

Ացիլազային ակտիվություն չի հայտնաբերված ացետիլ-DL-տրիպտոֆանի, բենզոլիլ-L-ասպարագինի և բենզոլիլ-L-հիստիդինի նկատմամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкан Э. К. Микробиологический синтез, вып. 1, 1—8, 1967.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
3. Ерошин В. К., Иерусалимский Н. Д., Скрыбин Г. К., Лозинов А. Б., Беликов В. М. Тез. докл. IX Международного конгресса по микробиологии, 264, 1966.

4. Рубан Е. Л., Харцхаева С. В. Микробиологический синтез, вып. 9, 11—14, 1968.
5. Хачатурян А. А. Биологический журнал Армении, **19**, 9, 35—44, 1966.
6. Юкно Кимур, Африкян Э. К. ДАН СССР, **173**, 4, 945—947, 1967.
7. Birnbaum S. M., Lewintow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P. J. Biol. Chem., **194**, 455, 1952.
8. Chibata I., Ischikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **24**, 1, 31—36, 1960.
9. Chibata I., Ischikawa T., Tosa T. Sympos. Enzyme Chem, **18**, 45—51, 1962.
10. Greenstein J. P., Winitz M. Chemistry of the amino acids. New—York—London, 1961.
11. Kindler S. H., Gilvarg C. J. Biol. Chem. **235**, 3532, 1960.
12. Methods in Enzymology, New—York Academic Press, vol. 2, pp. 109, 115, 1955.
13. Paik W. K., Bloch-Frankenthal L., Birnbaum S. M., Winitz M., Greenstein J. P. Arch. Biochem. Biophys. **69**, 56, 1957.
14. Vogel H. J. Proc. nat. Acad. Sci. U. S., **39**, 578, 1953.
15. Vogel H. J., Bonner D. M. J. Biol. Chem., **218**, 97, 1956.