

Յ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Ե. Ն. ՄԱԿԱՐՈՎԱ, Ժ. Ա. ԴԵՎՈՐԿՅԱՆ

## ОСОБЕННОСТИ УСВОЕНИЯ ДИКАРБОНОВЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ АМИДОВ КАК ИСТОЧНИКОВ АЗОТА ПРОДУЦЕНТАМИ ЛИЗИНА

Ауксотрофные мутанты *Micrococcus glutamicus* и *Brevibacterium* плохо усваивают в качестве основных источников азота глутаминовую и аспарагиновую кислоты, которые, способствуя некоторому приросту биомассы, не обеспечивают биосинтеза лизина. В этом качестве глутамин и аспаргин стимулируют все процессы жизнедеятельности, увеличивая вдвое выход лизина.

Использование же аминокислот и их амидов в качестве добавок к основному источнику азота — сульфату аммония, приводит к тому, что аспарагиновая кислота тормозит, а глутаминовая кислота, аспаргин и глутамин сильно стимулируют все функции клеток.

Одну из ведущих ролей в азотном метаболизме микроорганизмов играют дикарбоновые кислоты и их амиды [3]. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты в этом плане привлекают внимание исследователей еще и потому, что первая является не только хорошим источником азота, но и углерода, вторая же, являясь хорошим источником азота, может частично заменять потребность культур в биотине [8].

Амиды дикарбоновых кислот — аспаргин и глутамин, легко отщепляя амидные группы, являются легкодоступными источниками азота для большинства микроорганизмов и по своей усвояемости превосходят один из лучших неорганических источников азота — сульфат аммония [2, 3].

Несмотря на то, что роль указанных азотистых соединений в жизнедеятельности различных физиологических групп микроорганизмов определена, систематические исследования, касающиеся ауксотрофных мутантов-продуцентов лизина, не проводились.

Целью данного исследования явилось изучение роли глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также глутамина и аспарагина в процессах потребления глюкозы, накопления биомассы и лизина ауксотрофными штаммами-продуцентами лизина.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили ауксотрофные мутанты *Micrococcus glutamicus* шт. 28, 95 и *Brevibacterium* шт. 22.

Опыты проводились в жидкой синтетической среде следующего состава (%): глюкоза — 10,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,03;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,03; ДЛ-треонин — 0,1; ДЛ-метионин — 0,04; мел — 2,0; биотин — 20 мкг/л; для *Brevibacterium* шт. 22 — тиамин — 100 мкг/л [4, 7]. В качестве источников азота служили (%): сульфат аммония (контроль) — 2,0; ДЛ-глутаминовая кислота — 4,4; ДЛ-аспарагиновая кислота — 4,03; Л-глутамин — 2,2; Л-аспаргин — 4,0.

При использовании аминокислот как биостимуляторов последние брались в концентрации 0,01 М и добавлялись к среде с сульфатом аммония.

В течение всего опыта рН среды поддерживалась на уровне 7,2—7,5. Посевным материалом служила суточная культура, выращенная на рыбном агаре и внесенная в виде суспензии в количестве 0,5—0,8 мг сухого веса.

Ферментация проводилась в пробирках с 5 мл среды при 28° на качалках, продолжительность опытов—72 часа. Оценка результатов производилась следующими методами: синтезированный лизин—методом высоковольтного электрофореза в муравьиноксуснокислом буфере с рН 3,1 [1], количество биомассы—взвешиванием или нефелометрированием после растворения мела, потребление глюкозы—микрометодом с феррицианидом.

*Результаты и обсуждение.* Исследования проводились в двух направлениях: усвоение аминокислот и амидов, как основных источников азота и как добавок к среде с сульфатом аммония.

*Аминокислоты как основные источники азота.* Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние источников азота на некоторые процессы жизнедеятельности ауксотрофных мутантов  
Данные на 72-й час ферментации, % по отношению к контролю

Источники азота	Потребленная глюкоза	Накопленная биомасса	Синтезированный лизин
Сульфат аммония	100	100	100
<i>M. glutamicus</i> шт. 95			
Глутаминовая кислота	50	43	0
Аспарагиновая кислота	61	98	0
Глутамин	120	86	156
Аспарагин	77	76	106
<i>M. glutamicus</i> шт. 28			
Глутаминовая кислота	42	38	0
Аспарагиновая кислота	41	91	0
Глутамин	110	113	85
Аспарагин	38	67	83
<i>Brevibacterium</i> шт. 22			
Глутаминовая кислота	40	40	0
Аспарагиновая кислота	4	8	0
Глутамин	116	145	150
Аспарагин	98	98	174

Данные таблицы свидетельствует о том, что дикарбоновые кислоты и их амиды как источники азота не являются равноценными. Если интенсивность всех процессов, имеющих место при усвоении сульфата аммония, принять за 100%, то из всех изучаемых источников азота только глутамин обеспечивает более интенсивное, по сравнению с контролем, потребление глюкозы у всех культур. С аспарагином этот процесс протекает интенсивно у *M. glutamicus* шт. 95 и *Brevibacterium*, тогда как у *M. glutamicus* шт. 28 потребление глюкозы составляет около 40% от

контроля. Что же касается глутаминовой и аспарагиновой кислот, то за исключением *Brevibacterium* шт. 22, этот показатель составляет 40—50% у всех культур.

Прирост биомассы при усвоении амидов, особенно глутамина, происходит интенсивно у всех культур, и ее количество достигает 100 мг абсолютно сухого веса на 10 мл среды. При усвоении глутаминовой кислоты у всех штаммов он достигает 40% от контроля, тогда как при усвоении аспарагиновой кислоты приближается к контролю у обоих штаммов *M. glutamicus*. У *Brevibacterium* шт. 22 накопления биомассы почти не происходит.

Наиболее отчетливо выражена разница в действии изучаемых источников азота на процесс биосинтеза лизина. Оба амида способствуют высокому выходу (превышающему 20 г/л) лизина у *M. glutamicus* шт. 95 и *Brevibacterium* шт. 22. У *M. glutamicus* шт. 28 выход лизина составляет в среднем 10—12 г/л, тогда как глутаминовая и аспарагиновая кислоты полностью подавляют эту функцию у всех штаммов.

Поскольку слабое усвоение дикарбоновых кислот могло иметь место из-за высокой концентрации их в среде, были проведены опыты по влиянию разных концентраций аспарагиновой и глутаминовой кислот на жизнедеятельность ауксотрофных мутантов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние разных концентраций глутаминовой и аспарагиновой кислот на процессы потребления глюкозы, прироста биомассы и синтеза лизина у *Brevibacterium* шт. 22 на 72-ом час. ферментации

Источники азота (1 норма—100%)	Потребленная глюкоза, мг/10 мл	Накопленная биомасса, мг/10 мл	Синтезированный лизин, г/л
Сульфат аммония — 100%	800	72	13
Глутаминовая кислота, %			
100	330	38	0
75	280	44	0
50	200	30	0
25	140	20	0
Аспарагиновая кислота, %			
100	20	24	0
75	30	24	0
50	60	25	0
25	30	26	0

Данные таблицы свидетельствуют о том, что снижение концентрации аминокислот не влияет на степень ее усвоения и не является фактором, стимулирующим процесс биосинтеза лизина.

Однако усвояемость дикарбоновых кислот резко повышается при замене части их сульфатом аммония (табл. 3). Это явление в литературе известно как диауксия, т. е. поочередное использование источников питания [5].

Таблица 3

Влияние смесей дикарбоновых кислот и сульфата аммония на некоторые процессы жизнедеятельности *Brevibacterium* шт. 22, на 72-ом час. ферментации

Источники азота	Потребленная глюкоза, мг/10 мл	Накопленная биомасса, мг/10 мл	Синтезированный лизин, г/л
Сульфат аммония	800	72	13
Глутаминовая кислота	400	36	0
Глу + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
75% + 25%	560	52	4
50% + 50%	860	82	19
25% + 75%	920	90	19
Аспарагиновая кислота	20	24	0
Асп + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
75% + 25%	530	106	12
50% + 50%	720	114	14
25% + 75%	440	87	10

При замене части аминокислот сульфатом аммония глутаминовая и аспарагиновая кислоты ведут себя по-разному. В смеси с глутаминовой кислотой определяющим является сульфат аммония, и чем больше его доля, тем процессы потребления глюкозы и прироста биомассы протекают интенсивнее. Несмотря на то, что аспарагиновая кислота как основной источник азота практически не усваивается, в смеси с сульфатом аммония определяющей является именно она. Установлено, что оптимальным сочетанием является 50% сульфата аммония и 50% аминокислоты. При таком сочетании выход лизина составляет 19 г/л с глутаминовой кислотой и 14 г/л с аспарагиновой.

Результаты, полученные в этой серии опытов, позволили предположить, что дикарбоновые кислоты и их амиды в низких концентрациях могут играть роль биостимуляторов при использовании сульфата аммония как основного источника азота.

*Роль дикарбоновых кислот и их амидов как биостимуляторов.* Результаты опытов представлены в табл. 4.

Глутаминовая кислота и глутамин в концентрации 0,01 М действуют как биостимуляторы процесса биосинтеза лизина у всех культур, причем, по сравнению с контролем, выход лизина повышается приблизительно в два раза. Однако они не оказывают никакого влияния на процесс потребления глюкозы и приблизительно на 20% угнетают прирост биомассы у обоих штаммов *M. glutamicus*. У *Brevibacterium* шт. 22 глутаминовая кислота и глутамин на 30% стимулируют прирост биомассы.

Если действие глутаминовой кислоты и глутамина идентично, то аспарагиновая кислота и аспарагин действуют по-разному. У всех культур аспарагиновая кислота в концентрации 0,01 М тормозит процесс синтеза лизина на 20—50%. Аспарагин стимулирует этот процесс на 20—30% у штаммов *M. glutamicus* и на 117% у *Brevibacterium*. При сравнении глутаминовой кислоты и глутамина с аспарагиновой кислотой и аспарагином видно, что первая пара как источник азота и биостимулятор предпочтительнее [6].

Таблица 4

Аминокислоты как биостимуляторы процессов жизнедеятельности ауксотрофных мутантов, % по отношению к контролю на 72-ом час. ферментации

Источники азота	Потребленная глюкоза	Накопленная биомасса	Синтезированный лизин
Сульфат аммония	100	100	100
<i>M. glutamicus</i> шт. 95			
$\text{NH}_4^+$ + глутаминовая кислота	102	80	267
$\text{NH}_4^+$ + аспарагиновая кислота	90	51	46
$\text{NH}_4^+$ + глутамин	95	87	267
$\text{NH}_4^+$ + аспарагин	137	89	132
<i>M. glutamicus</i> шт. 28			
$\text{NH}_4^+$ + глутаминовая кислота	108	90	200
$\text{NH}_4^+$ + аспарагиновая кислота	81	51	57
$\text{NH}_4^+$ + глутамин	102	80	171
$\text{NH}_4^+$ + аспарагин	135	129	123
<i>Brevibacterium</i> шт. 22			
$\text{NH}_4^+$ + глутаминовая кислота	98	130	270
$\text{NH}_4^+$ + аспарагиновая кислота	81	81	80
$\text{NH}_4^+$ + глутамин	100	140	270
$\text{NH}_4^+$ + аспарагин	138	106	217

При сравнении же дикарбоновых кислот с их амидами становится очевидным, что амиды являются прекрасными источниками азота для ауксотрофных мутантов. Добавление их в низких концентрациях к сульфату аммония значительно повышает выход лизина. Дикарбоновые кислоты обеспечивают рост мутантов в большей или меньшей степени, но биосинтеза лизина при этом не происходит. Замена части аминокислот сульфатом аммония приводит к их усвоению, видимо, за счет повышения ферментативной активности клеток, когда начинается усвоение сульфата аммония. При этом выход лизина повышается. Однако в роли биостимулятора может выступать только глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота сильно тормозит процессы жизнедеятельности всех штаммов.

Институт микробиологии  
АН АрмССР

Поступило 13.VI 1973 г.

Զ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Ե. Ն. ՄԱԿԱՐՈՎԱ, Զ. Ա. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

ԳԻԿԱՐԲՈՆԱՅԻՆ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱՄԻԳՆԵՐԻ ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ԱԹԱՆՁՆՈՂԱՏԿՈՒԹՈՒՆՆԵՐԸ ԼԻՋԻՆԻ ՊՐՈԳՆՈՅԵՆՏՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

*Micrococcus glutamicus* և *Brevibacterium* աուքսոտրոֆ մուտանտները լատ են յուրացնում գլուտամինաթթուն և ասպարազինաթթուն որպես

ազոտի հիմնական աղբյուր, քանի որ վերջիններս նպաստում են կենսա-  
պանդվածի որոշ աճին, բայց չեն ապահովում լիզինի բիոսինթեզը: Այդ նույն  
նպատակով միջավայր մտցված գլուտամինը և ասպարագինը բարձրացնում  
են բջիջների կենսագործունեության որոշ պրոցեսներ, միաժամանակ երկու  
անդամ ավելացնելով լիզինի ելքը:

Երբ նշված ամինաթթուները և նրանց ամիդները օգտագործվում են որ-  
պես խթանիչներ՝ ամոնիումի սուլֆատի հետ միասին, ապա ասպարագինա-  
թթուն արգելակում է, իսկ գլուտամինաթթուն, ասպարագինը և գլուտամինը  
ուժեղ խթանում են բջիջ բուրք ֆունկցիաները:

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гордиенко С. В., Козлова А. Н., Беликов В. М. Журнал прикл. химии, 34, 4, 1966.
2. Зайцева З. М. Прикл. биох. и микробиол., 6, 2, 151, 1970.
3. Иерусалимский Д. А. Азотное и витаминное питание микробов. М., 1949.
4. Куцева Л. С., Ключева Н. М. Прикл. биох. и микробиол., 6, 2, 158, 1970.
5. Работнова И. Л., Иванова И. И. Успехи микробиологии, 7, 1971.
6. Elmerich Claudine Eur. J. Biochem., 27, 2, 1972.
7. Kinoshita et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 6, 193, 1960.
8. Koser S. A., Wright M. H., Dorfam A. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 51, 204, 1942.